



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201130977 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：099142522

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 06 日

(51)Int. Cl.：

C12N5/0789 (2010.01)

C12N5/077 (2010.01)

(30)優先權：2009/12/04

美國

61/266,825

2010/12/03

世界智慧財產權組織

PCT/US10/58980

2010/02/10

中華民國

099104520

(71)申請人：新幹細胞公司 (美國) NEOSTEM, INC. (US)

美國

(72)發明人：瑪拉斯科 韋恩 MARASCO, WAYNE (US)；米迪科堤 薩堤許 MEDICETTY,

SATISH (IN)；蔣雅娟 JIANG, YAJUAN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：6 共 117 頁

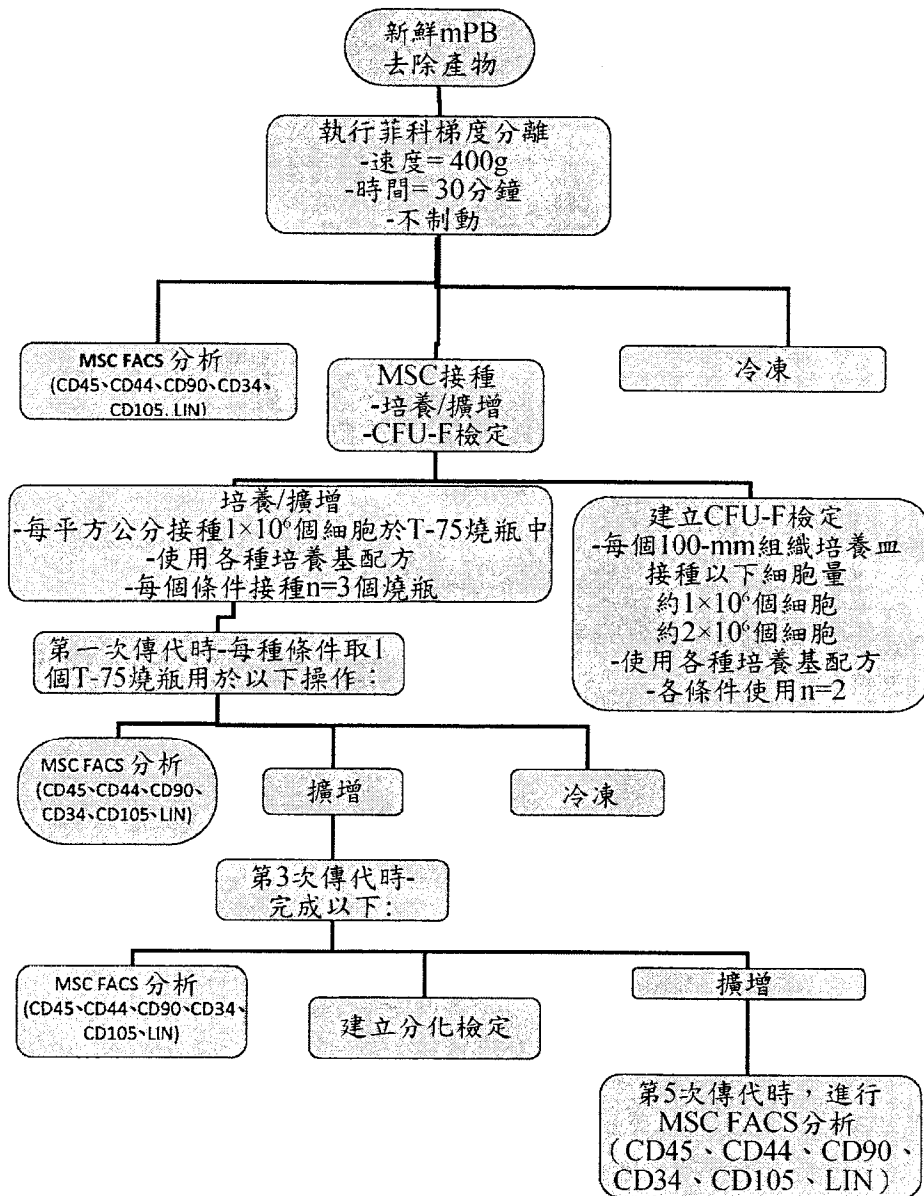
(54)名稱

從經調動之周邊血中分離之間質幹細胞

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCS) ISOLATED FROM MOBILIZED PERIPHERAL BLOOD

(57)摘要

本發明大體上係關於一種自得人類個體之周邊血樣品中獲得周邊血源性 MSC(PB 源性 MSC)及骨髓源性 MSC(BM 源性 MSC)之方法。特定言之，本發明係關於以下驚人發現：可在時間上調控 MSC 向周邊血中之調動且在諸如 G-CSF 或 GM-CSF 之調動劑投與人類個體後至少 2 天之後，人類周邊血中之循環 MSC 之數目達到峰值。因此，在一些實施例中，本發明係關於使用諸如 G-CSF 或 GM-CSF 之調動劑，自來自人類個體之周邊血，於活體內及離體下獲得 PB 源性及 BM 源性 MSC 的方法，其中 G-CSF 及/或 GM-CSF 之投與係經最佳化，以調動 MSC 且相對於諸如 HSC 之其他幹細胞群，富集周邊血中 MSC 之數目。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201130977 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：099142522

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 06 日

(51)Int. Cl.：

C12N5/0789 (2010.01)

C12N5/077 (2010.01)

(30)優先權：2009/12/04

美國

61/266,825

2010/12/03

世界智慧財產權組織

PCT/US10/58980

2010/02/10

中華民國

099104520

(71)申請人：新幹細胞公司 (美國) NEOSTEM, INC. (US)

美國

(72)發明人：瑪拉斯科 韋恩 MARASCO, WAYNE (US)；米迪科堤 薩堤許 MEDICETTY,

SATISH (IN)；蔣雅娟 JIANG, YAJUAN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：6 共 117 頁

(54)名稱

從經調動之周邊血中分離之間質幹細胞

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCS) ISOLATED FROM MOBILIZED PERIPHERAL BLOOD

(57)摘要

本發明大體上係關於一種自得人類個體之周邊血樣品中獲得周邊血源性 MSC(PB 源性 MSC)及骨髓源性 MSC(BM 源性 MSC)之方法。特定言之，本發明係關於以下驚人發現：可在時間上調控 MSC 向周邊血中之調動且在諸如 G-CSF 或 GM-CSF 之調動劑投與人類個體後至少 2 天之後，人類周邊血中之循環 MSC 之數目達到峰值。因此，在一些實施例中，本發明係關於使用諸如 G-CSF 或 GM-CSF 之調動劑，自來自人類個體之周邊血，於活體內及離體下獲得 PB 源性及 BM 源性 MSC 的方法，其中 G-CSF 及/或 GM-CSF 之投與係經最佳化，以調動 MSC 且相對於諸如 HSC 之其他幹細胞群，富集周邊血中 MSC 之數目。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於幹細胞，特定言之，用於自經調動之周邊血中分離人類間質幹細胞(MSC)之最佳時序的方法及組合物，及分離之MSC隨後諸如超低溫保存及/或用於治療有需要之個體的用途，諸如在自體再生醫學中。

【先前技術】

間質幹細胞(MSC)為在細胞療法領域具有重大效用之多能細胞。MSC可分化成至少3個下游間質細胞譜系(亦即骨母細胞、軟骨母細胞及脂肪細胞)。迄今為止，尚未鑑別出獨特MSC標記。因而，利用形態及功能標準鑑別此等細胞。參見Horwitz E等人，「Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement,」Cytotherapy 7:393 (2005)；及Dominici M等人，「Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement,」Cytotherapy 8:315 (2006)。因為MSC可分化成許多細胞類型，所以此項技術涵蓋供基於細胞之療法、再生醫學及重建醫學用的分化MSC之方法。

製備MSC組合物的典型方法係由根據MSC之塑膠黏著性質分離MSC及隨後對其培養擴增所組成。當在胎兒發育期間自人類體液分離MSC時，此方法相對容易。然而，自成人體液獲得MSC要複雜得多且可再現性要低得多。

通常，自成人骨髓、脂肪、軟骨及肌肉分離MSC。
Pittenger F等人，「Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells,」 *Science* 284:143-147 (1999)；
Zuk P等人，「Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies,」 *Tissue Eng.* 7:211-228 (2001)；及Young H等人，「Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors,」 *Anat. Rec.* 264:51-62 (2001)。

亦可自人類新生組織，諸如華頓氏膠質(Wharton's jelly)(Wang H等人，「Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord,」 *Stem Cells* 22:1330-1337 (2004))、人類胎盤(Fukuchi Y等人，「Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential,」 *Stem Cells* 22:649-658 (2004))；及臍帶血(Erices A等人，「Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood,」 *Br. J. Haematol.* 109:235-242 (2000))及人類胎兒組織(Campagnoli C等人，「Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow,」 *Blood* 98:2396-2402 (2001))分離MSC。

此項技術受限於不能分離出足夠的MSC供隨後分化及使用。在可利用適合供者的情況下，為分離甚至有限數目之

MSC所需的侵入性程序，諸如骨髓生檢，會給供者帶來顯著風險。亦難以維持所分離之MSC處於長期培養狀態及維持此等培養物不被細菌或病毒污染。

先前已報導可自人類非經調動之周邊血中分離MSC。Kassis I等人報導「使用血纖維蛋白微珠自經G-CSF調動之人類周邊血中分離間質幹細胞(Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads,)」Bone Marrow Transplant. 37:967-976 (2006)。Kassis I等人報導自經調動之周邊血及在較小程度上自非經調動之周邊血獲得MSC。已報導藉由投與粒細胞群落刺激因子(Granulocyte-colony Stimulating Factor; G-CSF)為期至少5天來將MSC調動至周邊血中。然而，此方法似乎有缺陷且可再現性不良，因為僅較小百分比之MSC經分離，且此等MSC的生長及擴增潛力有限。

因此，有必要找到自周邊血中獲得MSC之允許製備富集MSC群體的改良方法。

引用以上文獻並不意欲承認任何前述事項為相關先前技術。關於此等文獻之日期之所有陳述或內容之所有表述皆基於本申請人可用之資訊且並非承認關於此等文獻之日期或內容之正確性。

【發明內容】

本發明大體上係關於投與調動劑及自經調動之周邊血中收集特定幹細胞群之最佳時序的發現。特定言之，本發明人已發現在投與調動劑(諸如(但不限於)GM-CSF及G-CSF

或 AM3100(Plerixafor(普樂沙福)))之後自經調動之周邊血中收集並分離間質幹細胞(MSC)的最佳時序。換言之，本發明人已驚人地發現一種達成優良MSC產量的方法，其係藉由在投與調動劑之後在經調動之周邊血中之MSC含量最大時的最佳時間點分離經調動之MSC。

本發明人已驚人地發現，可在時間上調控MSC向周邊血中之調動，且在向人類個體投與調動劑(諸如G-CSF或GM-CSF)之後，人類周邊血中之循環MSC之數目達到峰值的時間與其他經調動之幹細胞群(諸如HSC)不同。因此，本發明人已證明，使用G-CSF或GM-CSF最佳化MSC向周邊血中調動之方案不同於通常用於將其他幹細胞(諸如CD34+HSC)調動至周邊血中的方案。

因此，本發明係關於以時間調控方式自骨髓調動不同幹細胞群的發現。特定言之，本發明人已發現，在投與特定幹細胞調動劑之後的不同時間，骨髓釋放或產生不同幹細胞群，且因此需要協調自經調動之周邊血中收集或分離某一幹細胞群之時序以使特定相關幹細胞群之分離最佳化。舉例而言，本發明人已發現向個體投與幹細胞調動劑將在不同時間以不同速率、不同持續時間及不同量調動幹細胞，且因此本發明人已發現欲自經調動之周邊血中收集之相關幹細胞將決定協調給藥方案及自經調動之周邊血中收集幹細胞。舉例而言，本發明人已發現周邊血調動因子(諸如GM-CSF及/或G-CSF)以獨特時間樣式調動不同幹細胞群(諸如造血幹細胞(HSC)、間質幹細胞(MSC)及其他幹

細胞群，諸如極小胚胎樣(VSEL)幹細胞(「VSEL」))進入周邊血中。

驚人的是，不同於GM-CSF及/或G-CSF之習知用途(投與其為期至少5天且在第6天收集HSC)，本發明人已意外發現可在投與GM-CSF及/或G-CSF約2天之後，在經調動之血液中達成MSC高濃度。因此，本發明人已發現獲得最佳MSC產量之方法，其中在投與該種調動劑至少1天，但至多4天之後自經調動之周邊血中收集或分離MSC。在一實施例中，投與該種調動劑約2天，且在投與調動劑之最後一天或在次日收集MSC。存在具有不同時間反應之其他調動劑，且其可用於在投與調動劑之後調動MSC至少1天且小於4天。

以習知劑量(例如通常為期5天，每天約5-10 µg/kg)之生長因子(諸如G-CSF或GM-CSF)調動幹細胞價格昂貴，且具有不良副作用，包括引起廣泛骨疼痛、頭痛、疲勞、潛在自發性脾破裂，且對正常供者具有未知副作用，包括造血惡性疾病及骨髓白血病(AML)之風險增加(參見Casheen等人，Bone Marrow Transplant, 2007, 39; 577-588)。另外，習知調動方案不可預測，導致產量較低，且通常會花費長達約4週之G-CSF或GM-CSF處理以收集足夠用於移植之材料。在生長因子處理之後，HSC CD34+細胞在血液中達到2-4%之最大含量。

通常自骨髓獲得MSC。先前已報導MSC以極低含量存在於周邊血及經調動之周邊血中(參見Wexler等人，British J.

Haematology, 2003; 121; 368-374; 「Adult Bone Marrow is a rich source of human mesenchymal 「stem」 cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not」)。此外，報導已論述並非所有經調動之血液皆可產生MSC(參見Kassis等人，Bone Marrow Transplantation, 2006; 37; 967-976)。此外，即使MSC係自非經調動之周邊血中收集，其亦不能足量收集用於未來的自體移植，即使培養擴增殖亦如此，原因為MSC具有衰老之性質且在喪失其多能潛力之前傳代次數有限。因此，本發明係關於以下驚人發現：與先前報導相反，在MSC於循環中處於最高產量時的最佳時間自經調動之周邊血中獲得或收集MSC時，可自經調動之周邊血中獲得供治療性使用的足量MSC。

本發明之另一態樣係關於以下發現：在稱為「調動」之過程中自骨髓遷移至周邊血中的MSC亦在周邊血中增殖。因此，如本文揭示之調動劑(諸如GM-CSF及G-CSF或其促效劑)可(i)投與個體以增強MSC自骨髓向周邊血中之調動以增加周邊血中骨髓源性MSC(在本文中稱為「BM源性MSC」)之數目，及/或(ii)可使個體之周邊血與調動劑(諸如GM-CSF及G-CSF)離體接觸以調動及增強MSC在周邊血中之增殖以增加周邊血中周邊血源性MSC(在本文中稱為「PB源性MSC」)之數目。欲用於實施本發明之其他調動劑包括選自由介白素-17、AMD3100、環磷醯胺(cyclophosphamide; Cy)歐洲紫杉醇(Docetaxel)及(DXT)組成之群之彼等調動劑。

因此，本發明之一態樣係關於向個體投與GM-CSF及/或G-CSF以增強MSC之活體內調動；及使個體周邊血中經調動之BM源性MSC及PB源性MSC的分離最佳化。

因此，本發明係關於自個體獲得周邊血源性人類間質幹細胞之方法，其包含：

- a. 向該個體投與有效量之G-CSF或GM-CSF為期4天或
小於4天；
- b. 自得自該個體之周邊血樣品獲得人類間質幹細胞
群，其中該等人類間質幹細胞對於CD34-、CD45-細
胞表面標記呈陰性，且對CD44+、CD90+、
CD105+、CD29+及CD73+細胞表面標記呈陽性；及
- c. 相對於周邊血中之其他成體幹細胞(somatic stem
cell)分離人類間質幹細胞。

本發明另外係關於增加個體之周邊血中人類間質幹細胞群的方法，其包含：

- a. 向個體之周邊投與有效量之G-CSF或GM-CSF為期4天
或小於4天；
- b. 自得自該個體之周邊血樣品獲得人類間質幹細胞群，
其中該等人類間質幹細胞對於CD34-、CD45-細胞表面
標記呈陰性，且對於CD44+、CD90+、CD105+、CD29+
及CD73+細胞表面標記呈陽性；及
- c. 相對於周邊血中其他成體幹細胞分離人類間質幹細
胞。

在本發明之一特定實施例中，向個體投與有效量之G-

CSF或GM-CSF為期3天或小於3天，為期2天或小於2天，或為期1天或小於1天。在本發明之另一實施例中，個體為健康個體。

本發明之另一態樣係關於使個體之周邊血與GM-CSF及/或G-CSF離體接觸；及使得自該個體之周邊血中經調動之PB源性MSC的分離最佳化。因此，本發明係關於自個體獲得人類間質幹細胞之方法，其包含：

- a. 使得自該個體之周邊血樣品與有效量之G-CSF或GM-CSF接觸以增加周邊血樣品中人類間質幹細胞之數目；
- b. 自周邊血樣品獲得人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於CD34-、CD45-細胞表面標記呈陰性，且對於CD44+、CD90+、CD105+、CD29+及CD73+細胞表面標記呈陽性；及
- c. 相對於周邊血中其他成體幹細胞分離人類間質幹細胞。

本發明亦關於自個體獲得人類間質幹細胞之方法，其包含：

- a. 使周邊血樣品與有效量之G-CSF或GM-CSF活體外接觸以增加周邊血樣品中人類間質幹細胞之數目；
- b. 自周邊血樣品中分離人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於CD34-、CD45-細胞表面標記呈陰性，且對於CD44+、CD90+、CD105+、CD29+及CD73+細胞表面標記呈陽性。

在本發明之一實施例中，周邊血樣品可經由血液析離術(apheresis)自個體獲得。周邊血樣品可為經培養之周邊血樣品。在本發明之另一實施例中，周邊血樣品可為新鮮周邊血樣品。得自周邊血之幹細胞群可經培養擴增。另外，得自周邊血之人類間質幹細胞可經超低溫保存。

在本發明之一實施例中，人類間質幹細胞群係使用基於尺寸之分離方法自周邊血樣品獲得。人類間質幹細胞群亦可使用排除非間質幹細胞之負向選擇法(negative selection)自周邊血樣品獲得，其中自包含間質幹細胞群及非間質幹細胞群的樣品中分離並收集人類間質幹細胞群。人類間質幹細胞群亦可使用任何以下方法之組合自周邊血中獲得：基於細胞表面標記之正向選擇、基於細胞表面標記之負向選擇、基於尺寸之正向選擇、基於尺寸之負向選擇。

本發明亦關於包含使用本發明方法所分離之實質上純人類間質幹細胞群的純系細胞株。純系細胞株可置放於包含適合培養基之容器中。另外，含有適合培養基及人類間質幹細胞群之純系細胞株的容器可經超低溫保存。

因此，相較於G-CSF或GM-CSF用於活體內調動之習知用途，本發明人提供的關鍵優點為顯著降低個體之風險及與調動程序相關之成本，甚至提供一種使收集細胞之時序最佳化為發現血液中之細胞(例如MSC)濃度最大時的時間，藉此增加經調動之細胞之產量及減少非MSC之污染的方法。

本發明之另一態樣係關於自周邊血離體調動MSC，其中使個體之周邊血與調動劑(諸如GM-CSF及G-CSF)接觸，且自經調動之周邊血離體收集並分離周邊血源性MSC。在一些實施例中，周邊血自個體(諸如人類個體)新鮮分離。在一些實施例中，周邊血來自血庫或已儲存於血庫中。在一些實施例中，周邊血已儲存或保藏。在一些實施例中，周邊血為月經血，如美國專利申請案2008/0241113中所揭示，該案以全文引用的方式併入本文中。

本發明之另一態樣係關於在周邊血中來自骨髓(例如BM源性MSC)或自周邊血(例如PB源性MSC)調動之MSC數目到達峰值之時間點分離間質幹細胞(MSC)。在一些實施例中，BM源性MSC及PB源性MSC可用於產生純系人類間質祖細胞株，且更特定言之，在一實施例中，提供一種利用BM源性MSC及PB源性MSC產生個別(例如個體特異性或個人化)純系MSC株之方法，該等MSC自個體之活體內或離體調動之周邊血獲得。

如本文所論述，本發明人已證明活體內投與低劑量之GM-CSF及G-CSF(例如相較於GM-CSF及G-CSF作為調動劑之習知用途，劑量更低)對於獲得周邊血中MSC數目之峰值數目及對於獲得存在於人類個體之周邊血中之經調動的PB源性及BM源性MSC之高產量最佳。因此，本發明人已證明低劑量之GM-CSF及G-CSF或其促效劑可活體內用於使自經調動之周邊血收集MSC最佳化，以便使用得自個體(例如人類周邊血)之MSC製備用於細胞療法之組合物。

在一些實施例中，本文所述之方法包括自個體獲得骨髓源性MSC或周邊血源性MSC。接著可將所有BM源性MSC或PB源性MSC或其亞群投與個體，例如MSC所來源之同一個體(例如同種異體移植(allogenic transplantation))或在某些情形中，投與第二個體(例如非同種異體移植)(HLA型匹配之第二個體)。在一些實施例中，方法亦包括例如使用血液析離術或白血球血液析離術(leukopheresis)自血液分離BM源性MSC及/或PB源性MSC。在一些實施例中，分離之BM源性MSC或PB源性MSC可投與有需要之個體，其中該個體與MSC所來源個體為同一個體(例如同種異體移植)，或在某些情形中投與第二個體(例如非同種異體移植)，諸如HLA型匹配之第二個體。在一些實施例中，有需要之個體患有選自由癌症及自體免疫疾病組成之群之病狀或需要再生療法。

在另一態樣中，本文所述之方法包括自個體獲得周邊血，使周邊血與有效量(例如足以離體增加周邊血中PB源性MSC之數目之量)之如本文所述之調動劑(諸如G-CSF或GM-CSF)接觸。在一些實施例中，周邊血中之PB源性MSC可在投與個體之前經分離、富集或純化。視情況而定，在一些實施例中，經處理之周邊血接著投與個體，例如同一個體或第二個體，例如HLA型匹配之第二個體。

本發明之一態樣係關於藉由自經調動之周邊血中分離間質幹細胞(MSC)且培養所獲得的組合物。此等組合物係使用GM-CSF及G-CSF作為調動劑獲得。

本發明係關於人類間質幹細胞群或其分化子代群治療有需要之個體之疾病或病症的用途，其中該人類間質幹細胞群係使用任何以上技術方案之方法分離，且其中向有需要之個體投與該人類間質幹細胞群或其分化子代群以達成自體再生療法。

在一實施例中，本發明係有關治療人類個體之方法，其中MSC之數目得以增加，且MSC經收集且用於細胞移植。本發明方法採用如專利及公開案中所述之MSC調動劑，包括GM-CSF及G-CSF，該等專利及公開案以引用的方式併入本文中。

因此，本發明提供用自體間質幹細胞(MSC)治療個體之疾病或病症之方法，其包含：

- a. 利用周邊血樣品之MSC群，其中該周邊血樣品得自調動劑已投與4天或小於4天之個體，且其中該MSC群為相對於周邊血中之其他幹細胞經富集的MSC群；及
- b. 向該個體投與該MSC群以治療該疾病或病症。

在本發明之一實施例中，可藉由正向選擇法或藉由淘洗法(elutriation)富集MSC。富集之MSC群可包含至少10% MSC。富集之MSC群可為實質上純MSC群。富集之MSC群可包含非MSC細胞。

另外，MSC群體可為已經超低溫保存之細胞群。另外，MSC細胞群可在投與個體之前已經活體外擴增。

本發明之一態樣係有關增加周邊血樣品中之MSC群的方

法，其中該周邊血樣品存在於個體，諸如人類個體內。

本發明之另一態樣係關於活體內或離體富集來自個體之周邊血樣品中之BM源性MSC及/或PB源性MSC群的方法。在一些實施例中，活體內方法包含藉由以下步驟自個體之富集間質幹細胞之周邊血中分離人類間質幹細胞群：(i)向該個體投與至少一種調動劑(諸如G-CSF或GM-CSF)，為期4天或小於4天；(ii)自該個體獲得周邊血樣品；(iii)使MSC群與該個體之周邊血中之其他細胞分離，及視情況(iv)培養MSC。培養及分離步驟亦可顛倒順序。亦即，如本文揭示之PB源性MSC或BM源性MSC可自周邊血分離且接著加以培養擴增。此分離之方法包括白血球血液析離術、密度梯度部分分離(density gradient fractionation)、免疫選擇及差異黏著分離。培養基可為化學上限定之無血清培養基或可為「完全培養基」，諸如DMEM或含有1 g血清之DMEM。適合的化學上限定之無血清培養基描述於1995年6月5日申請之美國專利第08/464,599號中，且「完全培養基」描述於1996年1月23日頒予之美國專利第5,486,359號中。在一些實施例中，得自個體之BM源性MSC及/或PB源性MSC在保藏(例如超低溫保存)之前經活體外擴增或培養。

在一些實施例中，實質上純人類MSC群係得自至少一種調動劑(例如G-CSF及/或GM-CSF)已投與4天或小於4天之人類個體，該群體為人類MSC之實質上純異源群體，包含BM源性人類MSC與PB源性人類MSC。

在一些實施例中，得自至少一種調動劑(例如 G-CSF 及 / 或 GM-CSF)已投與 4 天或小於 4 天之人類個體的實質上純人類 MSC 群包含 BM 源性人類 MSC 之實質上純群體。在替代性實施例中，得自至少一種調動劑(例如 G-CSF 及 / 或 GM-CSF)已投與 4 天或小於 4 天之人類個體的實質上純人類 MSC 群包含 PB 源性人類 MSC 之實質上純群體。

本發明之另一態樣係關於離體富集個體之周邊血樣品中 PB 源性 MSC 群的方法。在一些實施例中，離體方法包含藉由以下步驟自個體之富集間質幹細胞之周邊血中分離人類間質幹細胞群：使先前得自該個體之周邊血樣品與至少一種調動劑(諸如 G-CSF 或 GM-CSF)接觸為期 4 天或小於 4 天；使 MSC 群與周邊血樣品中之其他細胞分離，及視情況培養 MSC。在一些實施例中，得自先前得自個體之周邊血樣品的 PB 源性 MSC 可經保藏。在一些實施例中，保藏為超低溫保存。在一些實施例中，PB 源性 MSC 在保藏(例如超低溫保存)之前經活體外擴增或培養。

本發明之另一態樣另外係關於離體保藏藉由如本文揭示之方法獲得之經分離 PB 源性 MSC 或 BM 源性 MSC 的方法，其中該方法包含(i)向個體投與至少一種調動劑(諸如 G-CSF 或 GM-CSF)為期 4 天或小於 4 天；(ii)自個體獲得周邊血樣品；(iii)使 MSC 群與個體之周邊血中之其他細胞分離，及視情況(iv)培養 MSC；及(v)保藏經分離之 PB 源性 MSC 或 BM 源性 MSC。保藏較佳為超低溫保存。

本發明之另一態樣係關於用藉由如本文揭示之方法獲得

之PB源性MSC及/或BM源性MSC的實質上純群體治療需要治療之個體的方法，該方法包含向個體投與PB源性MSC或BM源性MSC之實質上純群體。在一些實施例中，PB源性MSC或BM源性MSC已藉由如本文揭示之方法新鮮分離，或在一些實施例中，PB源性MSC或BM源性MSC已藉由熟習此項技術者通常使用之已知方法加以超低溫保存。在一些實施例中，PB源性MSC及/或BM源性MSC之實質上純群體可藉由例如全身性輸注或局部植入(諸如藉由切開或關節鏡(arthroscopic)程序)需要產生新生組織之部位內加以投與。細胞可在再投與之前經保藏。

本發明之一態樣係關於自個體獲得周邊血源性人類間質幹細胞之方法，其包含：(a)向該個體投與有效量之G-CSF或GM-CSF為期4天或小於4天；(b)自該個體之周邊血樣品獲得人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於CD34⁻、CD45⁻細胞表面標記呈陰性，且對於CD44⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD29⁺及CD73⁺細胞表面標記呈陽性。在一些實施例中，本發明係關於增加個體之周邊血中人類間質幹細胞群之方法，其包含：(a)向該個體投與有效量之G-CSF或GM-CSF為期4天或小於4天；(b)自該個體之周邊血樣品獲得人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於CD34⁻、CD45⁻細胞表面標記呈陰性，且對於CD44⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD29⁺及CD73⁺細胞表面標記呈陽性，及(c)相對於周邊血中之成體幹細胞分離人類間質幹細胞。

本發明之另一態樣係關於自個體獲得人類間質幹細胞之方法，其包含：使得自該個體之周邊血樣品與有效量之G-CSF或GM-CSF接觸以增加周邊血樣品中人類間質幹細胞之數目；(b)自周邊血樣品獲得人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於CD34-、CD45-細胞表面標記呈陰性，且對於CD44+、CD90+、CD105+、CD29+及CD73+細胞表面標記呈陽性；及(c)相對於周邊血中之成體幹細胞分離人類間質幹細胞。

在一些實施例中，方法包含向個體投與調動劑(諸如有效量之G-CSF或GM-CSF、或AM3100)為期3天或小於3天。在一些實施例中，向個體投與有效量之調動劑(諸如G-CSF或GM-CSF或AM3100)為期2天或小於2天，或為期1天或小於1天。在一些實施例中，向健康個體投與有效量之調動劑。

在一些實施例中，人類間質幹細胞群係使用基於尺寸之分離方法(諸如淘洗)自周邊血樣品獲得。在一些實施例中，人類間質幹細胞群係使用排除非間質幹細胞之負向選擇法自周邊血樣品獲得，其中自包含間質幹細胞群及非間質幹細胞群的樣品分離並收集人類間質幹細胞群。

在一些實施例中，人類間質幹細胞群係使用任何以下方法之組合自周邊血獲得：基於細胞表面標記之正向選擇、基於細胞表面標記之負向選擇、基於尺寸之正向選擇、基於尺寸之負向選擇。

本發明之另一態樣係關於自個體獲得人類間質幹細胞之

方法，其包含：使周邊血樣品與有效量之G-CSF或GM-CSF活體外接觸以增加周邊血樣品中人類間質幹細胞之數目；(b)自周邊血樣品分離人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於CD34-、CD45-細胞表面標記呈陰性，且對於CD44+、CD90+、CD105+、CD29+及CD73+細胞表面標記呈陽性，及(c)相對於周邊血中之成體幹細胞分離人類間質幹細胞。

在一些實施例中，MSC係自所培養之經調動的周邊血樣品獲得。在一些實施例中，MSC係自作為新鮮周邊血樣品之周邊血樣品獲得。在一些實施例中，MSC係自得自周邊血樣品之經培養擴增的人類間質幹細胞群獲得。在一些實施例中，得自周邊血樣品之人類間質幹細胞群經超低溫保存。

在一些實施例中，個體為人類個體。本發明之另一態樣係關於純系細胞株，其包含使用任何以上技術方案之方法所分離之實質上純人類間質幹細胞群。

本發明之另一態樣係關於包含適合培養基及藉由如本文揭示之方法獲得之人類間質幹細胞群的純系細胞株之容器。在一些實施例中，適合培養基及人類間質幹細胞群之純系細胞株經超低溫保存。

本發明之另一態樣係關於超低溫保存之藉由任何如本文揭示之方法獲得的人類間質幹細胞群。本發明之另一態樣係關於人類間質幹細胞群或其分化子代群治療有需要之個體之疾病或病症的用途，其中人類間質幹細胞群係使用任

何以上技術方案之方法加以分離，且其中向有需要之個體投與該人類間質幹細胞群或其分化子代群以達成自體再生療法。

本發明之另一態樣係關於用自體間質幹細胞(MSC)治療個體之疾病或病症之方法，其包含：(a)利用周邊血樣品之MSC群，其中該周邊血樣品係自調動劑已投與4天或小於4天之個體獲得，且其中該MSC群相對於血液中之其他幹細胞群為經富集的MSC群；及(b)向該個體投與該MSC群以治療該疾病或病症。在一些實施例中，藉由正向選擇法富集MSC，在替代性實施例中，藉由淘洗富集MSC。

在一些實施例中，MSC群已經超低溫保存。在一些實施例中，富集之MSC群包含非MSC細胞，或在一些實施例中，富集之MSC群包含至少10% MSC或實質上純MSC群。在一些實施例中，MSC群在投與個體之前已經活體外擴增。在一些實施例中，個體為人類個體。

本發明另外提供自個體獲得周邊血源性人類幹細胞之方法，其包含：

- a. 向該個體投與有效量之調動劑為期4天或小於4天；
- b. 自得自該個體之周邊血樣品獲得人類幹細胞群；及
- c. 相對於周邊血中其他成體幹細胞分離人類幹細胞。

在本發明之一特定實施例中，幹細胞為間質幹細胞或「極小胚胎樣幹細胞(VSEL)」。另外，調動劑可為G-CSF或GM-CSF。或者，調動劑係選自由介白素-17、AMD3100、環磷醯胺(Cy)、歐洲紫杉醇及(DXT)組成之

群。

【實施方式】

間質幹細胞(MSC)為通常自骨髓獲得之非造血幹細胞。MSC存在於周邊血中的含量極低且自周邊血中收集導致用於治療性用途的量不足，即使其經活體外擴增亦如此。本發明人已發現可自經調動之周邊血中獲得MSC。特定言之，可自調動劑(例如(但不限於)G-CSF、GM-CSF、AMD3100等)已投與4天或小於4天(諸如約2天)之個體獲得並收集MSC(使用血液析離術及淘洗法收集)。在一些實施例中，自經調動之周邊血中所分離之人類MSC可經培養擴增及/或經超低溫保存以供未來使用，例如其中MSC可在再生療法中單獨或與其他細胞組合用於未來自體治療性應用，諸如創口癒合及骨修復及其他矯形適應症。

發明者已驚人地發現，可在時間上調控MSC向周邊血中之調動且在向人類個體投與調動劑(諸如G-CSF或GM-CSF)後至少1天之後，人類周邊血中之循環MSC之數目達到峰值。因此，本發明人已證明使用G-CSF或GM-CSF最佳化MSC向周邊血中調動之方案不同於通常用於將其他幹細胞(諸如CD34+ HSC)調動至周邊血中的方案。

本發明人已意外地發現，向人類個體投與G-CSF或GM-CSF之後短期(例如為期至少2天，但小於4天)便會在經調動之周邊血中得到MSC的最高產量，而非習知使用向個體投與5天G-CSF或GM-CSF之方案。因此，本發明人已確定，對於特定所要應用而言，投與幹細胞調動劑(諸如G-

CSF或GM-CSF)之方案需要藉由以下步驟加以最佳化：在不同條件下投與G-CSF或GM-CSF，且接著根據熟習此項技術者通常所知及如本文揭示之方法監測周邊血中之所要幹細胞亞群(諸如MSC、VESL、造血細胞)的輸出。應監測調動劑(諸如G-CSF或GM-CSF)投與後可供最佳回收或誘導血液中之特定細胞群的時限，因為在投與調動劑之後的期間會依序出現不同細胞類型。

本發明之另一態樣係關於得自個體經調動之周邊血之MSC的用途，其用於個人化醫學應用，諸如自體治療性用途，以及用於個人化檢定中以評估個人飲食、藥物遺傳學、神經化學品、生活方式對MSC功能及活力之影響。

定義

為方便起見，此處彙集在本文、說明書、實例及隨附申請專利範圍中所採用之某些術語。除非另作陳述或由上下文暗示，否則以下術語及片語包括下文提供之含義。除非另作明確陳述或由上下文顯而易知，否則以下術語及片語不排除術語或片語在其所屬技術中已獲得之含義。提供定義以幫助描述特定實施例，且不意欲限制所主張之本發明，因為本發明之範疇僅由申請專利範圍限制。除非另外定義，否則本文使用之所有技術及科學術語皆具有與本發明所屬技術中之一般技術者通常理解相同的含義。

術語「間質幹細胞」在本文中亦稱為「MSC」，其係指能夠分化成一種以上特定類型之間質或結締組織(亦即支持特異化元件之身體組織；例如脂肪結締組織、骨結締組

織、基質結締組織、軟骨結締組織、彈性結締組織及纖維結締組織)的萬能幹細胞。人類間質幹細胞(hMSC)與稱為SH2⁻、SH3及SH4之某些單株抗體具有反應性。(參見美國專利第5,486,359號，其以全文引用的方式併入本文中)。MSC可基於其免疫特異性概況而與HSC區分，且其中MSC為SH2⁺/CD14⁻且人類HSC為SH2⁻/CD14⁺。出於鑑別之目的，可基於以下鑑別人類MSC：(i)CD34⁻、CD45⁻、CD90⁺、CD105⁺及CD44⁺之表型標記表現，(ii)功能表型，包括在如本文實例中揭示之CFA檢定中形成群落形成單位(colony forming unit)之能力，及分化成支持特異化元件(包括(但不限於)軟骨細胞、軟骨及脂肪細胞)之組織之能力。由MSC表現之其他標記在此項技術中為已知的且包括(但不限於)CD71、CD73、Stro-1、CD166及CD271。在某些實施例中，MSC為lin⁻。

術語「極小胚胎樣幹細胞」在本文中亦稱為「VSEL幹細胞」且係指萬能幹細胞。在一些實施例中，VSEL幹細胞(「VSEL」)為人類VSEL且可表徵為lin⁻、CD45⁻及CD34⁺。在一些實施例中，VSEL為人類VSEL且可表徵為lin⁻、CD45⁻及CD133⁺。在一些實施例中，VSEL為人類VSEL且可表徵為lin⁻、CD45⁻及CXCR4⁺。在一些實施例中，VSEL為人類VSEL且可表徵為lin⁻、CD45⁻、CXCR4⁺、CD133⁺及CD34⁺。人類VSEL表現SSEA-4、Oct-4、Rex-1及Nanog之至少一者且具有由窄邊緣之細胞質包圍之大核，且含有胚胎型無定形染色質。VSEL亦具有高端粒酶活

性。在一些實施例中，VSEL為人類VSEL且可表徵為lin⁻、CD45⁻、CXCR4⁺、CD133⁺、Oct 4⁺、SSEA4⁺及CD34⁺。在一些實施例中，人類VSEL可具有較小原生性且可表徵為lin⁻、CD45⁻、CXCR4⁺、CD133⁻及CD34⁺。在一些實施例中，人類VSEL可富含萬能胚胎轉錄因子，例如Oct-4、Sox2及Nanog。在一些實施例中，人類VSEL可具有4-5 μm、4-6 μm、4-7 μm、5-6 μm、5-8 μm、6-9 μm或7-10 μm之直徑。

如本文所用之術語「周邊血源性MSC」或「PB-MSC」係指僅自周邊血調動之MSC，且可包括周邊血中之MSC的擴增/增殖。在一些實施例中，可藉由根據如本文揭示之方法使周邊血與調動劑活體內或離體接觸來增加周邊血中循環PB-MSC之數目。

如本文所用之術語「骨髓源性MSC」或「BM-MSC」係指自骨髓調動至周邊血中之MSC，且可包括已自BM遷移之MSC。在一些實施例中，周邊血中之BM-MSC包括在遷移至周邊血中之前已在骨髓中增殖之MSC，或者在自骨髓遷移之後已在周邊血中增殖之MSC。在一些實施例中，可根據如本文揭示之方法、藉由使周邊血與調動劑活體內接觸來增加周邊血中循環BM-MSC之數目。

亦稱為「HSC」之術語「造血幹細胞」係指尤其在骨髓中及周邊血中發現之能夠分化成任何特定類型之造血細胞或血球(諸如紅血球、淋巴細胞、巨噬細胞及巨核細胞)的所有幹細胞或祖細胞。HSC與目前視為對造血細胞具有特

異性之某些單株抗體(例如CD34)具有反應性。

亦稱為「HSC」之術語「造血細胞」係指在自我更新造血幹細胞經由各種血系之不成熟前驅細胞分化成(且包括)成熟功能血球之整個過程中之所有類型的造血細胞，如熟習此項技術者所瞭解。

如本文所用之術語「調動」係指細胞藉此離開骨髓且進入血液之過程。調動可藉由化學引誘劑(例如細胞激素)與存在於周邊組織及骨髓之幹細胞小生境中之幹細胞集合池或群體喪失黏附性的組合來實現。

「有效量」為足以實現周邊血中之MSC之數目及/或頻率顯著增加的量。有效量可以一或多次投藥、用藥或給藥投與。調動劑之治療有效量視所選調動劑(例如G-CSF或GM-CSF)而定。諸如G-CSF或GM-CSF之調動劑可每天投與一或多次至每週投與一或多次；包括每隔一天投與一次。熟習此項技術者將瞭解某些因素可影響為有效治療個體所需之劑量及時序，該等因素包括(但不限於)先前治療、個體之綜合健康及/或年齡、及存在之其他疾病。此外，用如本文所述之治療有效量之G-CSF或GM-CSF治療個體可包括單一治療或一系列治療。

術語「間質細胞」或「間質」在本文中可互換使用且在一些情況下係指在幼小胚胎之外胚層與內胚層之間所發現的紡錘狀或星狀細胞；大多數間質細胞來源於所建立之中胚層，但在頭部區域中，其亦由神經脊或神經管外胚層發育而成。間質細胞具有萬能能力，特定言之，胚胎主體中

之胚胎間質細胞能夠在不同位置發育成任何類型之結締組織或支持組織、平滑肌、血管內皮及血球。

如本文所用，術語「幹細胞」在廣義上使用且包括傳統幹細胞、祖細胞、先祖細胞、儲備細胞(reserve cell)及其類似細胞。術語「幹細胞」或「祖細胞」在本文中可互換使用，且係指能夠增殖及產生更多祖細胞之未分化細胞，該等祖細胞能夠產生許多母細胞，該等母細胞又可產生經分化或可分化之子細胞。子細胞自身可經誘導而增殖且產生子代，隨後分化成一或多種成熟細胞類型，同時亦使一或多種細胞保留親本發育潛力。術語「幹細胞」則指具有在特定情況下可分化成更特異化或經分化表型之能力或潛力的細胞，及保留在某些情況下增殖而不實質上分化之能力的細胞。在一實施例中，術語祖細胞或幹細胞係指廣義母細胞，其後代(子代)通常在不同方向上藉由分化而特異化，例如獲得完全個別特徵，如胚細胞及組織之漸進多樣化中所發生一樣。細胞分化為一種通常經由多次細胞分裂而發生之複雜過程。分化細胞可來源於多能細胞，多能細胞自身來源於多能細胞，諸如此類。儘管此等多能細胞之各者可視為幹細胞，但各者可產生之細胞類型之範圍可顯著變化。一些分化細胞亦具有產生發育潛力較大之細胞的能力。此能力可為天然的或可在各種因子處理時經人工誘導。在許多生物學情況下，幹細胞亦具有「多能」，因為其可產生一種以上獨特細胞類型之子代，但此不為「主幹性質(stem-ness)」所必需。自我更新為幹細胞定義之另一

經典部分，且其如本文件中所用為重要的。在理論上，自我更新可藉由兩種主要機制之任一者而發生。幹細胞可不對稱分裂，其中一個子代保留主幹狀態且另一子代表現一些獨特之其他特定功能及表型。或者，群體中之一些幹細胞可對稱分裂成兩個幹細胞，從而總體上維持群體中之一些幹細胞，而群體中之其他細胞僅產生分化子代。在形式上，以幹細胞形式開始之細胞有可能向分化表型進展，但接著「逆轉」且再表現幹細胞表型，此過程用通常稱為「反分化(dedifferentiation)」之術語描述。

例示性幹細胞包括胚胎幹細胞、成人幹細胞、萬能幹細胞、神經幹細胞、肝幹細胞、肌肉幹細胞、肌肉前驅幹細胞、內皮祖細胞、骨髓幹細胞、軟骨性幹細胞、淋巴樣幹細胞、間質幹細胞、造血幹細胞、中樞神經系統幹細胞、周邊神經系統幹細胞及其類似幹細胞。對幹細胞之描述(包括分離及培養幹細胞之方法)尤其可見於Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols, Turksen編，Humana Press, 2002；Weisman等人，Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17:387-403；Pittinger等人，Science, 284:143-147, 1999；Animal Cell Culture, Masters編，Oxford University Press, 2000；Jackson等人，PNAS 96(25):14482-86, 1999；Zuk等人，Tissue Engineering, 7:211-228, 2001(「Zuk等人」)；Atala等人，尤其第33-41章；及美國專利第5,559,022號、第5,672,346號及第5,827,735號。對基質細胞之描述(包括分離基質細胞之方法)尤其可見於Prockop, Science, 276:71

74, 1997 ; Theise 等人 , Hepatology, 31:235 40, 2000 ; Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino 等人編 , John Wiley & Sons, 2000(包括直至2002年3月之更新) ; 及美國專利第4,963,489號。

術語「祖細胞」在本文中用於指相對於可藉由分化產生之細胞，更具原生性細胞表型之細胞(例如處於比完全分化細胞早之沿發育路徑之階段或進程)。通常，祖細胞亦具有顯著或極高增殖潛力。視發育路徑及細胞發育及分化之環境而定，祖細胞可產生多種獨特分化細胞類型或單一分化細胞類型。

如上所指示，可依據「幹細胞」之一般定義將細胞分為不同等級或種類。存在「全能(totipotent)」、「萬能(pluripotent)」及「多能(multipotent)」幹細胞。術語「全能」係指幹細胞可產生體內任何組織或細胞類型。「萬能」幹細胞可產生體內除生殖系細胞之外的任何類型細胞。可產生較小或有限數目之不同細胞類型的幹細胞一般稱為「多能」。因此，全能細胞分化成可產生大多數(但非所有)為胎兒發育所必需之組織的萬能細胞。萬能細胞進一步分化成專門產生具有特定功能之細胞的多能細胞。舉例而言，多能造血幹細胞產生血液中之紅血球、白血球及血小板。

如本文所用之術語「萬能」係指細胞能夠在不同條件下分化成為所有3個生殖細胞層(內胚層、中胚層及外胚層)所特有之細胞類型。萬能細胞的主要特徵為其能夠分化成所

有3個胚層(使用例如裸小鼠畸胎瘤(teratoma)形成檢定)。萬能性亦藉由表現胚胎幹(ES)細胞標記證實，但萬能性之較佳測試為證明可分化成3個胚層之每一者之細胞的能力。在一些實施例中，萬能細胞為未分化細胞。

如本文所用之術語「萬能性」或「多能狀態」係指細胞能夠分化成所有3個胚胎胚層：內胚層(消化道組織)、中胚層(包括血液、肌肉及血管)、及外胚層(諸如皮膚及神經)，且通常具有可長期(例如1年以上或傳代30次以上)活體外分裂的潛力。

術語「多能」在關於「多能細胞」使用時係指細胞能夠分化成一些(但非所有)來源於所有3個胚層之細胞。因此，多能細胞為部分分化細胞。多能細胞在此項技術中已熟知，且多能細胞之實例包括成人幹細胞，諸如造血幹細胞及神經幹細胞。多能意謂幹細胞可形成指定譜系中許多類型之細胞，而非其他譜系之細胞。舉例而言，多能血液幹細胞可形成許多不同類型之血球(紅血球、白血球、血小板等)，但其不能形成神經元。

術語「多能性」係指細胞發育多功能性(versatility)程度小於全能及萬能。

術語「全能性」係指細胞具有描述形成成人體內所有細胞以及胚胎外組織(包括胎盤)之能力的分化程度。與早期分裂細胞(分裂球(blastomere))一樣，受精卵(合子)具有全能性。

如本文所用之術語「經分離細胞」係指已自個體移除之

細胞或該種細胞之後代，其中該細胞最初在該個體中被發現。細胞視情況已例如在其他細胞存在下經活體外培養。視情況隨後將藉由如本文揭示之方法產生之細胞(例如經分離PB源性MSC或經分離BM源性MSC)引入第二個體中或再引入已分離(例如同種異體移植)之該細胞(或其所來源之細胞)所來源之個體中。

如本文所用之關於經分離細胞群之術語「經分離群體」係指已移除且與混合或異質細胞群分離之細胞群。在一些實施例中，相較於細胞已分離或富集之異質群體，經分離群體為實質上純細胞群。在一些實施例中，經分離群體為經分離重新編程之細胞群，其相較於包含重新編程之細胞及該等重新編程之細胞所來源之細胞之異質細胞群為重新編程之細胞的實質上純群體

關於特定細胞群之術語「實質上純」係指就組成總細胞群之細胞而言，細胞群之純度為至少約75%、較佳至少約85%、更佳至少約90%且最佳至少約95%。換而言之，關於使用如本文揭示之方法所分離之PB源性MSC或BM源性MSC群體的術語「實質上純」或「基本上經純化」係指PB源性MSC或BM源性MSC群含有小於約20%、更佳小於約15%、10%、8%、7%、最佳小於約5%、4%、3%、2%、1%或小於1%的細胞不為如本文術語所定義之PB源性MSC或BM源性MSC。在一些實施例中，本發明涵蓋擴增PB源性MSC或BM源性MSC群之方法，其中經擴增之PB源性MSC或BM源性MSC群為PB源性MSC或BM源性MSC之實質

上純群體。

如本文所用，「增殖」係指群體中之細胞數目藉助於細胞分裂而增加(生長)。細胞增殖通常理解為由多個信號轉導路徑回應於環境(包括生長因子及其他有絲分裂原)之協調活化所致。亦可藉由脫離阻斷或負性影響細胞增殖之細胞內或細胞外信號及機制之作用而促進細胞增殖。

術語「再生」意謂在疾病或損傷之後，細胞群、器官或組織之再生長。

術語「富集」或「經富集」在本文中可互換使用且意謂某一類型之細胞之產量(分數)比彼類型之細胞在起始培養物或製備物中之分數增加至少10%。

術語「更新」或「自我更新」或「增殖」在本文中可互換使用，且係指細胞產生該細胞自身之更多複本之過程(例如複製)。在一些實施例中，重新編程之細胞能夠藉由長期及/或多月至多年分裂成相同未分化細胞(例如萬能或非特異化細胞類型)而自我更新。在一些情況下，增殖係指重新編程之細胞藉由單個細胞重複分裂成兩個相同子細胞而擴增。

如本文所用之術語「譜系」係指描述具有共同祖先之細胞或具有共同發育命運之細胞(例如來源於相同PB源性MSC或BM源性MSC之細胞或其子代)的術語。

如本文所用，術語「純系細胞株」係指可在培養中維持且有無限繁殖之潛力的細胞譜系。純系細胞株可為幹細胞株(例如PB源性MSC或BM源性MSC細胞株)或來源於PB源

性 MSC 或 BM 源性 MSC，且當該純系細胞株用於包含 PB 源性 MSC 或 BM 源性 MSC 之純系細胞株之情形中時，該術語係指已在允許數月至數年增殖而不分化之活體外條件下培養的 PB 源性 MSC 或 BM 源性 MSC。此等純系幹細胞株(例如 PB 源性 MSC 或 BM 源性 MSC)可具有沿來自原始幹細胞之若干細胞譜系分化的潛力。

在細胞個體發育之情形下，形容詞「分化」或「正分化」為相關術語。「分化細胞」為已沿著發育路徑進一步發展(與其所比較之細胞相比)的細胞。因此，幹細胞可分化成受譜系限制的前驅細胞(諸如中胚層幹細胞)，其又可分化成沿路徑進一步發展之其他類型之前驅細胞(諸如心肌細胞前驅體)，且接著分化成末期分化細胞，其在某一組織類型中起特徵性作用，且可或可不保留進一步增殖之能力。

本文中之術語「分化」意謂形成表現標記之細胞，該等標記已知與更特異化及更接近變為不能進一步分化之末期分化細胞的細胞相關。細胞自分化方向尚未確定之細胞進展成分化方向日益確定成特定細胞類型之細胞且最終發展成末期分化細胞所沿的路徑稱為漸進分化或漸進定型。更特異化(例如已開始沿漸進分化之路徑進展)但尚未經末期分化之細胞稱為部分分化。分化為細胞藉此呈現特異化表型，例如獲得一或多種不同於其他細胞類型之特徵或功能的發育過程。在一些情況下，分化表型係指某一發育路徑中之成熟終點時的細胞表型(所謂末期分化細胞)。在許多

(但非所有)組織中，分化過程與退出細胞週期有聯繫。在此等情況下，末期分化細胞喪失或極大限制其增殖能力。然而，應注意在本說明書之情形下，術語「分化」或「經分化」係指細胞在其命運或功能方面比其發育中之先前點時更特異化，且包括末期分化之細胞與儘管未末期分化但比其發育中之先前點時更特異化之細胞。細胞自未定型細胞(例如幹細胞)發育成分化程度日益確定成特定分化細胞類型之細胞且最終發育成末期分化細胞稱為漸進分化或漸進定型。相對於祖細胞「經分化」之細胞相對於彼祖細胞具有一或多種表型差異。表型差異包括(但不限於)形態學差異及基因表現及生物活性差異，不僅包括存在或不存在經表現之標記，而且包括標記之量之差異及一組標記之共表現樣式之差異。

如本文所用之術語「分化」係指細胞自原生階段向更成熟(亦即原生性較小)細胞之細胞發育。

如本文所用之術語「定向分化」係指經由遺傳及/或環境操作迫使細胞自未分化細胞類型(例如更具原生性細胞)分化成更成熟細胞類型(亦即原生性較小之細胞)。在一些實施例中，如本文揭示重新編程之細胞定向分化成特定細胞類型，諸如神經元細胞類型、肌細胞類型及其類似細胞類型。

如本文提及之術語「培養基」為維持組織或細胞群或培養細胞群的介質(例如「培養基」)，其含有維持細胞活力及支持增殖之養分。細胞培養基可含有以下任一者之適當

組合：鹽類、緩衝劑類、胺基酸、葡萄糖或其他糖類、抗生素、血清或血清替代物、及其他組分，諸如肽生長因子等。一般用於特定細胞類型之細胞培養基為熟習此項技術者所知。

術語「表型」係指在一組特定環境條件及因素下定義細胞或有機體之一種或許多總生物特徵，而不論實際基因型。

如本文所用之「標記」描述細胞之特徵及/或表型。標記可用於選擇包含相關特徵之細胞。標記將隨特定細胞而變化。標記為特定針對一種細胞類型或該細胞類型所表現之分子的特徵(不論形態、功能或生物化學(酶促)特徵)。此等標記較佳為蛋白質，且更佳具有針對此項技術中可用之抗體或其他結合分子的抗原決定基。然而，標記可由細胞中所發現之任何分子(包括(但不限於)蛋白質(肽及多肽)、脂質、多醣、核酸及類固醇)組成。形態特徵或性狀之實例包括(但不限於)形狀、尺寸、及核與細胞質之比率。功能特徵或性狀之實例包括(但不限於)黏附於特定受質之能力、合併或排除特定染料之能力、在特定條件下遷移之能力、及沿特定譜系分化之能力。可藉由熟習此項技術者可用之任何方法偵測標記。

如本文關於活體內接觸周邊血樣品所用之術語「接觸」可包含經由適當投藥途徑向個體投與調動劑(視情況含於組合物中)以使化合物活體內接觸周邊血樣品。如本文關於離體接觸周邊血樣品所用之術語「接觸」可包含向周邊

血樣品中投與調動劑(視情況含於組合物中)以使該調動劑離體接觸該周邊血樣品。

如本文所用，術語「投與」、「引入」及「移植」可互換使用且係指藉由使人類PB源性MSC或BM源性MSC至少部分定位在所要部位處之方法或途徑將如本文所述之周邊血源性MSC或骨髓源性MSC置入個體中。人類PB源性MSC或BM源性MSC可藉由可傳遞至個體中之所要位置之任何適當途徑投與，其中至少一部分人類PB源性MSC或BM源性MSC仍存活。細胞投與個體之後的存活期可短至數小時(例如24小時)至數天，至長達數年。

如本文所用，術語「供者」係指所收集之待移植器官、組織或細胞所來源之個體。

如本文所用，術語「接受者」係指將接受所移植器官、組織或細胞之個體。

如本文所用之術語「移植」係指藉以將游離(未附著)細胞、組織或器官在移植入個體中之後整合入組織中的過程。

術語「同種異體移植物」係指來源於相同物種之不同動物之所移植細胞、組織或器官。

如本文所用之術語「異種移植物(xenograft/xenotransplant)」係指來源於不同物種之動物的所移植細胞、組織或器官。在一些實施例中，異種移植物為來自某一物種之組織藉由手術植入不同物種、屬或科中的移植物。舉例而言，自狒狒植入人體中之移植物為異種移植物。

術語「異種移植」係指活細胞、組織或器官自某一物種移植至另一物種(諸如自豬移植至人體中)之過程。

術語「個體(subject)」與「個體(individual)」在本文中可互換使用，且係指可根據本文所述之方法及組合物分離且收集之如本文揭示之PB源性MSC及BM MSC所來源的動物，例如人類，且個體視情況可接受移植(例如PB源性MSC或BM源性MSC可植入個體中)用於例如治療，包括預防性治療疾病。對於治療為諸如人類個體之特定動物所特有之疾病狀態，術語「個體」係指彼特定動物。術語「非人類動物」及「非人類哺乳動物」在本文中可互換使用，且包括哺乳動物，諸如大鼠、小鼠、兔、綿羊、貓、犬、奶牛、豬及非人類靈長類動物。術語「個體」亦涵蓋任何脊椎動物，包括(但不限於)哺乳動物、爬行動物、兩棲動物及魚。然而，個體宜為諸如人類之哺乳動物，或其他哺乳動物，諸如馴養哺乳動物(例如犬、貓、馬及其類似動物)或生產哺乳動物(例如奶牛、綿羊、豬及其類似動物)亦涵蓋在術語個體中。

術語「組織」係指類似特異化細胞之群組或層，其共同執行某些特殊功能。術語「組織特異性」係指來自特定組織之細胞之來源特徵或限定性特徵。

如本文所用之術語「藥劑」意謂任何化合物或物質，諸如(但不限於)小分子、核酸、多肽、肽、藥物、離子等。

「藥劑」可為任何化學品、實體或部分，包括(但不限於)合成及天然存在之蛋白及非蛋白實體。在一些實施例中，

藥劑為核酸；核酸類似物；蛋白質；抗體；肽；適體；核酸、胺基酸或碳水化合物之寡聚物，包括(但不限於)蛋白質、寡核苷酸、核糖核酸酶、DNA酶、糖蛋白、siRNA、脂蛋白、適體及其修飾形式及組合等。在某些實施例中，藥劑為具有化學部分之小分子。舉例而言，化學部分包括未經取代或經取代烷基、芳族或雜環基部分，包括巨環內酯(macrolide)、來普黴素(leptomycin)及其相關天然產物或類似物。化合物可已知具有所要活性及/或性質，或可選自不同化合物之集合庫。

如本文所用，術語「小分子」係指化學藥劑，其可包括(但不限於)肽、肽模擬物、胺基酸、胺基酸類似物、聚核苷酸、聚核苷酸類似物、適體、核苷酸、核苷酸類似物、分子量小於約10,000公克/莫耳之有機或無機化合物(例如包括雜有機化合物及有機金屬化合物)、分子量小於約5,000公克/莫耳之有機或無機化合物、分子量小於約1,000公克/莫耳之有機或無機化合物、分子量小於約500公克/莫耳之有機或無機化合物、及此等化合物之鹽、酯及醫藥學上可接受之其他形式。

術語「疾病」或「病症」在本文中可互換使用，且係指身體或一些器官狀態之任何改變，從而中斷或干擾功能之執行及/或引起罹患者或與個體接觸者之症狀，諸如不適、功能障礙、痛苦、或甚至死亡。疾病或病症亦可指瘟熱、不舒服、失調、混亂、異常、噁心、病患、不適、微恙或病變。

如本文所用之術語「病理」係指造成疾病或病症之症狀，例如細胞、組織或器官之結構及功能變化。舉例而言，病理可與特定核酸序列或「病理性核酸」相關，該病理性核酸係指完全或部分造成病理之核酸序列，舉例而言，病理性核酸可為編碼具有引起特定病理或與病理相關之突變或多形現象(polymorphism)之基因的核酸序列。病理可與完全或部分造成與特定疾病或病症相關之病理之病理性蛋白質或病理性多肽的表現相關。在另一實施例中，病理例如與其他因素(例如缺血及其類似因素)相關。

如本文所用，術語「治療」包括減輕或緩和病狀、疾病或病症之至少一種不良反應或症狀。

如本文所用之片語「非經腸投藥」意謂除經腸及局部投藥以外之投藥方式，通常為注射，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、心室內、囊內、眶內、心內、真皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內、腦脊髓內、及胸骨內注射及輸注。如本文所用之片語「全身性投藥」、「周邊投藥」意謂PB源性MSC或BM源性MSC或其分化子代及/或其子代及/或化合物及/或其他物質以使其進入動物全身中且從而經受代謝及其他類似過程的方式投與(例如皮下或靜脈內投與)，而非直接進入個體中。

片語「醫藥學上可接受」在本文中用於指在合理醫學判斷之範疇內適用於與人類及動物組織接觸而無過度毒性、刺激、過敏反應或其他問題或併發症且與合理效益/風險

比率相稱的彼等化合物、物質、組合物及/或劑型。

如本文所用之片語「醫藥學上可接受之載劑」意謂在自身體之某一器官或部分傳送或輸送標的藥劑至身體之另一器官或部分中所涉及的醫藥學上可接受之物質、組合物或媒劑，諸如液體或固體填充劑、稀釋劑、賦形劑、溶劑或囊封物質。各載劑在可與調配物之其他成分相容之意義上必須為「可接受」。

如本文所用之術語「藥物」或「化合物」係指投與個體以治療或預防或控制疾病或病狀之化學實體或生物製品，或化學實體或生物製品之組合。化學實體或生物製品較佳(但非必定)為低分子量化合物，但亦可為較大化合物，例如核酸、胺基酸、或碳水化合物之寡聚物，包括(但不限於)蛋白質、寡核苷酸、核糖核酸酶、DNA酶、糖蛋白、siRNA、脂蛋白、適體及其修飾形式及組合。

如本文所用之術語「移植」係指將新細胞(例如PB源性MSC或BM源性MSC或其分化子代)或組織(諸如由PB源性MSC或BM源性MSC產生之分化細胞)或器官引入宿主(亦即移植物接受者或移植物個體)中。

術語「調節」的用法與其在此項技術中之用法一致，例如引起或促進相關過程、路徑或現象之定性或定量變化、改變或修改。此變化可為(不限於)過程、路徑或現象之不同組分或分支之相對強度或活性的增加、減小或變化。

「調節劑」為引起或促進相關過程、路徑或現象之性質或數量變化、改變或修改之藥劑。

術語「減少」、「降低」或「抑制」在本文中一般皆用於意謂以統計學顯著量減少。然而，為避免疑問，「降低」或「減少」或「抑制」意謂相較於參考含量減少至少10%，例如減少至少約20%、或至少約30%、或至少約40%、或至少約50%、或至少約60%、或至少約70%、或至少約80%、或至少約90%或多達且包括100%降幅(例如相較於參考樣品，不存在含量)，或相較於參考含量為介於10-100%之間的任一降幅。

術語「增加」或「增強」或「活化」在本文中一般皆用於意謂以統計學顯著量增加；為避免任何疑問，術語「增加」或「增強」或「活化」意謂相較於參考含量增加至少10%，例如增加至少約20%、或至少約30%、或至少約40%、或至少約50%、或至少約60%、或至少約70%、或至少約80%、或至少約90%或多達且包括100%增幅，或相較於參考含量為介於10-100%之間的任一增幅，或為參考含量之至少約2倍、或至少約3倍、或至少約4倍、或至少約5倍或至少約10倍，或為介於2倍與10倍或10倍以上之間的任一增幅。

術語「統計學顯著」或「顯著」係指統計學顯著性且通常意謂比標記之標準或較低濃度低兩倍標準差(2SD)。該術語係指證實存在差異的統計學證據。其定義為當虛無假設實際上真實時，決定排除虛無假設的機率。常使用p值作出決定。如本文所用之術語「實質上」意謂至少約60%、或較佳至少約70%或至少約80%、或至少約90%、至

少約95%、至少約97%或至少約99%或99%以上，或介於70%與100%之間之任何整數的比例。

如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，除非上下文另外明確規定，否則單數形式「一」及「該」包括複數個參考物。因此，舉例而言，提及「該方法」包括本文所述及/或熟習此項技術者在閱讀本發明時將顯而易知的一或多個方法及/或步驟類型，諸如此類。

應瞭解以上詳細說明及以下實例僅具有說明性且不應視為限制本發明之範疇。可在不脫離本發明之精神及範疇的情況下對所揭示之實施例進行各種修改及潤飾，此等修改及潤飾將為熟習此項技術者顯而易知。另外，所鑑別之所有專利、專利申請案及公開案皆以引用的方式明確併入本文中，以用於描述及揭示例如此等公開案中所述之可配合本發明使用之方法的目的。在本申請案之申請日期之前，此等公開案僅為揭示其所提供。就此而言，不應理解為承認本發明人因先前發明或任何其他原因而無權將本發明之日期提前。關於此等文獻之日期之所有陳述或內容之所有表述皆係基於本申請人可用之資訊且不構成關於此等文獻之日期或內容之正確性的任何承認。

MSC調動劑

在本發明之一態樣中，提供治療方法，其包含向哺乳動物(例如人類)投與有效量之調動劑，例如某一形式之G-CSF或GM-CSF及其醫藥學上可接受之鹽，以增強(刺激)MSC產生/釋放，如依據表型、物理或化學性質或熟習

此項技術者用於鑑別MSC型細胞之任何其他特徵所量度。

在一實施例中，在約2次每日一次注射投與諸如GM-CSF或G-CSF之調動劑之後，得到循環MSC的峰值數目。周邊血中循環MSC之峰值在至少4次每日一次注射之後下降。

任何間質調動劑或間質調動劑之組合可在規定時間投與個體以最佳化MSC向周邊血中之調動。在一些實施例中，MSC調動劑為GM-CSF或G-CSF(粒細胞群落刺激因子)。在一些實施例中，可以單一調動劑或此等調動劑之組合形式向個體投與其他調動劑，包括(但不限於)G-CSF、GM-CSF、Flt-3配位體、幹細胞因子(SCF)、地塞米松(dexamethazone)、CXCR4受體抑制劑、介白素-1(IL-1)、介白素-3(IL-3)、戴尼普司亭(Diniplestim)(IL-3促效劑)、來立司亭(Leridistim)(IL-3促效劑-G-CSF嵌合分子)、祖細胞生成素-1(Progenipoietin-1)(Flt-3配位體-G-CSF嵌合分子)、聚乙二醇化非格司亭(peg-filgrastim)(NEULASTA™)、介白素-8(IL-8)、PIXY-321(GM-CSF/IL-3融合蛋白)、巨噬細胞發炎性蛋白、幹細胞因子(SCF)、血小板生成素(thrombopoietin)及生長相關之致癌基因。其他調動劑包括例如(但不限於)揭示於美國專利第7,169,750號中之CXCR4抑制劑，諸如AMD3100、ALX40-4C、T22、T134、T140及TAK-779，該專利以全文引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，諸如G-CSF或GM-CSF、或介白素-17(IL-17)、AMD3100、環磷醯胺(Cy)及歐洲紫杉醇(DXT)及

其組合之調動劑可混合投與個體或離體投與周邊血樣品以刺激PB源性MSC。

在一些實施例中，諸如G-CSF或GM-CSF之調動劑可與治療上或營養上適用之其他活性成分混合投與個體或離體投與周邊血樣品，該等其他活性成分諸如抗生素、維生素、草本萃取物、消炎劑、葡萄糖、解熱劑、止痛劑、粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、介白素-1(IL-1)、介白素-3(IL-3)、介白素-8(IL-8)、PIXY-321(GM-CSF/IL-3融合蛋白)、巨噬細胞發炎性蛋白、幹細胞因子、血小板生成素及其類似物。

使用例如G-CSF或GM-CSF之調動劑所產生之經調動的周邊血幹細胞集群(PBSC)可移植入例如癌症患者中。此等集群可為經調動之白血球或自經調動之周邊血獲得之純化HSC的總群體。HSC能夠使有機體之造血系統重組，此需要HSC之自我更新以及分化成各種造血譜系之細胞。CD34標記為HSC所特有。使用此等調動劑調動的其他細胞包括多形核白血球(介導發炎及病原體清除之細胞)、單核白血球(淋巴細胞及單核細胞)及紅血球祖細胞(紅血球母細胞)。

CD34+ HSC之調動為一種獲得用於自體或同種異體造血移植之材料的快速擴增臨床技術。此外，多形核白血球之調動為沉重化學療法之重要輔助手段以維持先天防禦機制。當前，兩種方法均依賴昂貴、會引起骨疼痛且對正常供者具有未知副作用的生長因子(G-CSF或GM-CSF)進行調

動。花費長達約4週之處理來收集足夠用於移植之材料。在生長因子處理之後，CD34+細胞在血液中達到2-4%之最大含量。

G-CSF：

在一些實施例中，用於如本文揭示之方法中之G-CSF可使用重組方法製備且可使用G-CSF之變異體。根據本發明之術語G-CSF或G-CSF變異體涵蓋所有天然存在之G-CSF變異體、以及來源於其之藉由重組DNA技術修飾之G-CSF蛋白，尤其除G-CSF部分外亦含有其他蛋白質序列之融合蛋白。就此含義而言，尤其較佳為在位置1具有N端Met殘基之G-CSF突變蛋白(mutein)，其適於在原核細胞中表現。可根據WOA-91/11520製備之不含甲硫胺酸之重組G-CSF變異體同樣適合，該專利以全文引用的方式併入本文中。術語「G-CSF變異體」應理解為包含一或多個胺基酸可缺失或經其他胺基酸置換之彼等G-CSF分子，其具有G-CSF之基本性質，特定言之能夠調動大量保留之骨髓細胞。適合G-CSF突變蛋白描述於例如EP0,456,200中，該專利以全文引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，如本文揭示之方法及組合物中可使用熟習此項技術者所知之任何市售形式之G-CSF，例如(但不限於)Neupogen®(F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland)及其變異體。

GM-CSF：

根據本發明，可使用利用重組方法所製備之GM-CSF(粒

細胞-巨噬細胞群落刺激因子)及其變異體。根據本發明之術語 GM-CSF 或 GM-CSF 變異體涵蓋所有天然存在之 GM-CSF 變異體、以及來源於其之藉由重組 DNA 技術修飾之 GM-CSF 蛋白，尤其除 GM-CSF 部分外亦含有其他蛋白質序列之融合蛋白。就此含義而言，尤其較佳為在位置 1 具有 N 端 Met 殘基之 GM-CSF 突變蛋白，其適於在原核細胞中表現。可根據 WOA-91/11520 製備之不含甲硫胺酸之重組 GM-CSF 變異體同樣適合，該專利以全文引用的方式併入本文中。術語「GM-CSF 變異體」應理解為包含一或多個胺基酸可缺失或經其他胺基酸置換之彼等 G-CSF 分子，其具有 GM-CSF 之基本性質，特定言之能夠調動大量保留之骨髓細胞。適合 GM-CSF 突變蛋白描述於例如 EP0,456,200 中，該專利以全文引用的方式併入本文中。

在 4 種『粒細胞-巨噬細胞』CSF 中，GM-CSF 最先經分離及表徵。GM-CSF 顯示可誘導含有粒細胞及巨噬細胞祖細胞之鼠類骨髓源性或脾源性造血細胞增殖，從而產生主要含有粒細胞及巨噬細胞前驅體之群落。就此而言，GM-CSF 似乎與隨後表徵之 IL-3 具有共同生物性質。然而，更近的研究表明相較於 IL-3，GM-CSF 對『更晚期』多能細胞起作用。此外，GM-CSF 刺激紅血球系及巨核細胞前驅體增殖之活性似乎小於 IL-3。然而，與 IL-3 類似，GM-CSF 顯示可對粒細胞及巨噬細胞譜系之成熟細胞具有活性。

不希望受理論束縛，GM-CSF(粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子)直接且選擇性地對粒細胞/巨噬細胞祖細胞起作用

以刺激屬於此等譜系之細胞(例如嗜中性白血球、嗜伊紅血球、巨噬細胞)的活體外生長及分化。亦已證明重組GM-CSF之此等多效性活性。除調控骨髓譜系之祖細胞/前驅細胞之增殖及分化之外，GM-CSF亦已顯示可活化成熟骨髓細胞類型之功能。舉例而言，已發現GM-CSF可誘導巨噬細胞對抗惡性黑素瘤細胞株A375之殺腫瘤活性。IFN γ 亦可充當巨噬細胞活化因子，但與GM-CSF相反，其需要另一種二級刺激物(例如細菌LPS)以誘發殺腫瘤活性。此外，GM-CSF活化巨噬細胞以抑制克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)(一種單細胞寄生蟲，其為卻格司氏病(Chagas disease)或美洲錐蟲病(American trypanosomiasis)之發病原因)複製且增強呼吸氧化過程。此外，HIV-1在人類單核細胞細胞株U937中之複製已顯示可被GM-CSF中度抑制，且可被GM-CSF與IFN γ 之組合更有效抑制。

在嗜中性白血球及嗜伊紅血球中，GM-CSF刺激許多功能。特定言之，GM-CSF增強嗜中性白血球對細菌及酵母之吞噬作用。經純化之重組人類GM-CSF亦已顯示可增強嗜中性白血球及嗜伊紅血球對抗經抗體包覆之目標細胞的細胞毒性活性。

已報導當小鼠用重組鼠類GM-CSF重複腹膜內注射時，腹膜巨噬細胞、粒細胞(嗜中性白血球及嗜伊紅血球)之數目及功能活性快速且持續增加且循環單核細胞之數目亦增加。(GM-CSF通常花費約兩週以起作用)。將重組人類GM-CSF注射於AIDS患者及非人類靈長類動物中之後，亦已觀

測到嗜中性白血球、嗜伊紅血球及單核細胞數目之明顯增加。然而，可能存在與 GM-CSF 療法相關之併發症。Metcalf 及同事已證明，含有組成性表現之鼠類 GM-CSF 基因的轉殖基因小鼠在出生後不久即於各種組織(包括晶狀體、視網膜及橫紋肌)中出現由活化之巨噬細胞浸潤所引起的病理性病變。(活化之巨噬細胞已知會產生許多可誘發組織損傷之發炎性介體，包括細胞激素，諸如 TNF α 及 IL-1)。

與 GM-CSF 之生長刺激作用相反，GM-CSF 可充當分化因子。其對例如成熟巨噬細胞及嗜中性白血球之作用可視為其分化誘導能力的結果。一種限制腫瘤細胞增殖之方式為使生長因子驅動之自我更新與生長因子誘導之分化脫離聯繫。換言之，『分化』腫瘤細胞越多，其增殖能力越小。就此而言，GM-CSF 已顯示可誘導骨髓白血病細胞株 HL60 分化且抑制其自我更新。然而，在若干其他研究中，GM-CSF 刺激 HL60 細胞增殖。可藉由量測各種質膜相關抗原(例如 CD14(單核細胞/巨噬細胞標記)及 CD57(NK 細胞標記))之表現來監測分化。

在一些實施例中，如本文揭示之方法及組合物中可使用熟習此項技術者所知之任何市售形式之 GM-CSF，例如(但不限於)Leucomax®(Schering Plough-Sandoz Pharma Ltd., Basel, Switzerland)及其變異體。

投藥劑量、持續期、頻率、途徑(腹膜內(i.p)、皮下(sc))

G-CSF 或 GM-CSF 之劑量可視各種因素(諸如用藥方式、

物種、年齡或個體狀況)而定。在一些實施例中，皮下(s.c.)施用 G-CSF 或 GM-CSF 的劑量為每天約 100 至 700 μg 之 G-CSF 或 GM-CSF。歷時至少 2 天、或至少 3 天且至多 4 天每天至少一次投與 G-CSF 或 GM-CSF。

G-CSF 或 GM-CSF 之不同劑量包括(但不限於)每天約至少 100 μg 、或至少約 200 μg 、或至少約 300 μg 、或至少約 400 μg 、或至少約 500 μg 、或至少約 600 μg 、或至少約 700 μg 、或 700 μg 以上 G-CSF 或 GM-CSF。在一些實施例中，劑量不超過每天 1000 μg ，歷時 2 天。在一些實施例中，G-CSF 或 GM-CSF 之劑量為每天約 450 μg ，為期至少 1 天但小於 4 天。在一些實施例中，G-CSF 或 GM-CSF 之劑量為每天約 400 μg 或每天約 500 μg ，為期至少 1 天但小於 4 天。在一些實施例中，G-CSF 之給藥持續期為小於 5 天，且因為此等劑量已與嚴重副作用相關聯，所以較佳為每天小於 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、或每天小於 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，該等副作用包括脾長度增加、頭痛、噁心、疲勞及骨疼痛，且在一些情況下包括自發性脾破裂(參見以下評述：Cashen 等人，Bone marrow transplantation, 2007; 39; 577-588 及 Pusic 等人，Current Pharmaceutical Design, 2008; 14; 1950-1961，其以全文引用的方式併入本文中)。

如本文所揭示，本發明人已證明，每天 450 μg 之劑量在皮下投藥至少 1 天之後得到 PB 源性 MSC 的大部分調動。另外，熟習此項技術者顯而易知，可嘗試增加或減少 G-CSF 或 GM-CSF 之劑量以找到針對各用途之最佳劑量。此可簡

單地如下進行：向個體投與遞增劑量之G-CSF或GM-CSF且分析血液樣品，例如如本文所述獲取之血液樣品。此外，視欲調動之細胞而定，可以可能高於或低於每天450 µg之最佳濃度每小時(或以其他間隔時間)輸注G-CSF或GM-CSF，而非依序增加基於每日之劑量。亦可檢查投與G-CSF或GM-CSF之不同頻率及持續期。

G-CSF或GM-CSF之適合劑量範圍視此等考量而變化，但一般而言，化合物的投與劑量範圍為每天約100 µg、或至少約200 µg、或至少約300 µg、或至少約400 µg、或至少約500 µg、或至少約600 µg、或至少約700 µg、或700 µg以上之G-CSF或GM-CSF。相較於例如靜脈內投藥，當化合物經口或經皮投與時，劑量可較高。

對於如本文所揭示向個體投與G-CSF或GM-CSF，可使用此項技術中熟知之普遍瞭解調配技術調配G-CSF或GM-CSF以投與動物個體，諸如人類。適用於特定投藥方式之調配物可見於Remington's Pharmaceutical Sciences, 最新版，Mack Publishing Company, Easton, Pa中。

在一些實施例中，使用標準投藥形式(其中注射溶液較佳)向諸如人類之個體投與G-CSF或GM-CSF。水較佳用作注射介質，其包括注射溶液中常見之佐劑，諸如穩定劑、增溶劑及緩衝劑。舉例而言，此等佐劑為酒石酸鹽及檸檬酸鹽緩衝劑；乙醇；錯合劑，諸如乙二胺四乙酸及其無毒鹽；用於控制黏度之高分子量聚合物，諸如液體聚氧化乙烯。注射溶液之液體媒劑必須無菌且較佳裝填入安瓿中。

G-CSF 或 GM-CSF 較佳藉由注射，最佳藉由靜脈內注射，但亦藉由皮下或腹膜內注射及其類似方式投與諸如人類之個體。其他非經腸投藥途徑包括肌肉內及關節內注射。對於靜脈內或非經腸投藥，G-CSF 或 GM-CSF 必要時可用賦形劑調配成適合液體形式。G-CSF 或 GM-CSF 可於脂質體或其他適合載劑中投與個體，諸如人類個體。對於靜脈內注射，使用諸如亨克氏溶液(Hank's solution)之標準製劑使溶液具有等張性。

除注射之外，亦可使用其他投藥途徑。在一些實施例中，待投與個體(諸如人類個體)之 G-CSF 或 GM-CSF 可調配成錠劑、膠囊劑、糖漿、散劑或適於經口投與之其他形式。藉由使用適合賦形劑，G-CSF 或 GM-CSF 可使用栓劑或鼻內噴霧劑經由黏膜投與。經皮投藥亦可藉由使用適合滲透劑且控制釋放速率實現。

除靜脈內輸注外，G-CSF 或 GM-CSF 之不同投藥途徑亦有效。舉例而言，皮下或腹膜內所置放之 G-CSF 或 GM-CSF 之「儲槽(depot)」可提供長期連續輸注且為提供 G-CSF 或 GM-CSF 之便利且有效方法。若皮下或腹膜內投與 G-CSF 或 GM-CSF，則可達成例如連續輸注且隨時間監測個體。或者，可經口投與 G-CSF 或 GM-CSF。本發明包括藉由此等手段及如由熟習此項技術者所瞭解之所有其他手段投與 G-CSF 或 GM-CSF。

不同的 G-CSF 或 GM-CSF 投藥方案(包括不同的 G-CSF 或 GM-CSF 劑量、G-CSF 或 GM-CSF 投藥途徑及持續期)將調

動不同幹細胞群，諸如MSC。如上所論述，本發明人已驚人地發現，用於最佳化調動MSC的GM-CSF及G-CSF投藥方案不同於習知用於調動HSC之方案。因此，可針對特定所要應用最佳化方案：在不同條件下投與G-CSF或GM-CSF，接著根據如本文揭示之方法監測血液中所要幹細胞亞群(諸如MSC或造血細胞)之輸出。因為如本文實例中所指示，在投與調動劑之後的時段，不同細胞類型會依序出現，所以應監測輸注之後達成最佳化回收或誘導血液中之特定細胞群的時間。

所選調配物及投藥途徑應適合個別個體、待治療之個體病狀之性質、及一般而言主治從醫者之判斷。

在一些實施例中，G-CSF或GM-CSF可以單次快速給藥、隨時間給藥(如靜脈內或經皮投藥)或多次給藥投與個體，諸如人類個體。

除直接投與個體外，G-CSF或GM-CSF可用於離體處理方案中以自個體之周邊血樣品中分離MSC，其可用於製備MSC培養物，該等培養物可視情況經超低溫保存及儲存且隨後在需要MSC時用於個體之基於細胞的再生治療。在一些實施例中，MSC之此離體產生可用於分離並收集自體MSC，該等自體MSC自周邊血或在一些情況下自匹配供者之同種異體移植物收集。單獨或與其他藥劑(諸如巨噬細胞發炎性蛋白)組合離體接觸周邊血的調動劑之濃度為常規最佳化的問題。

藉由投與G-CSF或GM-CSF，可觀測到脾中粒細胞大量

生成及脾重量顯著增加，根據Bungart等人，Brit. J. Haem. 76, 174-179, 1990，此可歸因於幹細胞調動或MSC調動。

在一些實施例中，用於如本文揭示之方法之周邊血樣品係自哺乳動物個體，諸如人類個體獲得。在一些實施例中，人類個體先前已投與調動劑以增加周邊血中循環幹細胞之產量或數目。任何調動劑皆可諸如根據此項技術中通常所知之方法，且包括例如(但不限於)如美國專利申請案6,261,549及美國專利申請案2009/0155225中揭示之方法加以使用，該等專利申請案以全文引用之方式併入本文中。

在一些實施例中，諸如G-CSF或GM-CSF之調動劑可與任何一或多種其他調動劑混合投與個體或離體投與周邊血樣品，該等其他調動劑例如為選自由以下組成之群之藥劑：介白素-17(IL-17)、AMD3100、環磷醯胺(Cy)及歐洲紫杉醇(DXT)及其組合。

在一些實施例中，諸如G-CSF或GM-CSF之調動劑可與治療上或營養上適用之其他活性成分混合投與個體或離體投與周邊血樣品，該等其他活性成分諸如抗生素、維生素、草本萃取物、消炎劑、葡萄糖、解熱劑、止痛劑、粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、介白素-1(IL-1)、介白素-3(IL-3)、介白素-8(IL-8)、PIXY-321(GM-CSF/IL-3融合蛋白)、巨噬細胞發炎性蛋白、幹細胞因子、血小板生成素及其類似物。

任何個體皆可使用如本文揭示之方法進行MSC調動，且可自得自任何個體(諸如人類個體，包括成人或非新生兒

兒童)之周邊血調動並收集MSC。此外，MSC可以一或多個收集步驟或收集週期收集。舉例而言，可自個體之經調動周邊血收集(例如使用血液析離術)MSC至少2次、至少3次、或至少5次。在各收集步驟期間，自每公斤體重個體所收集之總有核細胞的數目可為一百萬(1×10^6)或一百萬以上(例如 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、 1×10^{18} 、 1×10^{19} 、 1×10^{20})。在較佳實施例中，視供者個體之體重及年齡而定，在單批收集中所收集之析離產物(其用於MSC與非MSC之分離)中的細胞數目可等於或大於 1×10^{15} 個總有核細胞(TNC)，或至少約 1×10^{14} 、 1×10^{13} 、 1×10^{12} 、 1×10^{11} 、 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 個總有核細胞。

視情形及可使用如本文揭示之方法自任何人類個體供者獲得之MSC而定，較佳可在人類個體供者處於「成人」或「成熟」年齡(除非另外在特定情境中使用以獲得不同含義，否則如本文所用之術語「成人」係指且包括成人及非新生兒)及/或某一最小體重時自其收集幹細胞。舉例而言，當個體在10至200 kg之範圍內(根據本發明之一實施例)或此範圍內之任何範圍內時，諸如20至40 kg內時，可收集MSC。或者或此外，根據本發明之一實施例，可要求個體具有2-80歲範圍(例如2-10、10-15、12-18、16-20、20-26、26-30、30-35、30-40、40-45、40-50、55-60、60-65、60-70及70-80歲)內之某一年齡。

MSC與周邊血中其他幹細胞群之分離

自周邊血獲得並分離PB源性MSC及BM源性MSC之方法在此項技術中已熟知，且包括白血球血液析離術、密度梯度部分分離、免疫選擇及差異黏著分離。實質上純MSC群可於培養基(諸如化學上限定之無血清培養基或完全培養基(諸如DMEM或含有1 g血清之DMEM))中收集。適合的化學上限定之無血清培養基描述於1995年6月5日申請之美國專利第08/464,599號中，且「完全培養基」描述於1996年1月23日頒予之美國專利第5,486,359號中，該等專利以引用的方式併入本文中。

本發明之一態樣為使用離心淘洗自經調動之周邊血中分離MSC。不希望受理論束縛，在一種淘洗方法中，將周邊血樣品引入位於旋轉離心機上之漏斗狀分離室中。接著將液體淘洗緩衝液流或低密度液流引入含有周邊血樣品之腔室中。當通過腔室之液體淘洗緩衝溶液之流速增加(通常以逐步方式)時，液體將尺寸較小、沈降較慢之細胞掠向腔室內之淘洗邊界，而沈降較快的較大細胞遷移至離心力與沈降(拖曳(drag))力平衡之室內區域。因此，當周邊血(例如經調動之周邊血)包含許多不同幹細胞群時，本發明之一態樣係關於使用淘洗法，將存在於周邊血中之此等不同幹細胞群分離成不同群體，其中分離出較小幹細胞與尺寸較大之幹細胞(fractionate)。

在本發明之一些態樣中，任何淘洗裝置皆可用於獲得PB源性MSC及BM源性MSC且使其與周邊血中其他幹細胞群

分離。在一些實施例中，淘洗裝置係使用析離產物(其中血小板及血球返回至個體供者中)，且剩餘周邊血產物為析離產物，其以某一流速經淘選，以將周邊血樣品部分分離成包含MSC群之部分。在一些實施例中，市售淘洗裝置(例如由Gambro BCT, Inc製造之ELUTRA®離心機)可用於自周邊血中分離MSC。ELUTRA CELL SEPARATION SYSTEM®能夠利用尺寸與密度，將經調動之周邊血分離成包含MSC之部分，從而使細胞之富集、排除(depletion)、濃縮及洗滌皆能夠在封閉式功能系統內進行。ELUTRA CELL SEPARATION SYSTEM®能夠直接自白血球析離產物富集幹細胞群，而無需抗體或在小於1小時內進行預處理。Elutra Cell Separation System®係使用逆流離心淘洗法，其中流體在離心場中流過細胞層，以分離細胞群。

在一些實施例中，其他淘洗裝置(包括(但不限於)亦由Gambro BTC Inc.製造之COBE® Spectra析離系統、Trima®系統及Trima Accel®系統，以及用於分離血液組分之其他市售淘洗裝置)可用於自周邊血中，分離MSC。

在一些實施例中，MSC群可使用細胞分離器(諸如COBE® Spectra析離系統)，自經調動之周邊血樣品獲得。COBE® SPECTRA™離心機描述於美國專利4,425,172、4,708,712及6,022,306中，該等專利以引用的方式併入本文中。在該實施例中，將經調動之周邊血樣品(或自己根據如本文揭示之方法投與調動劑之個體獲得的析離產物)引

入細胞分離器(諸如 COBE Spectra析離系統)中，且視情況添加抗凝血劑溶液至血液中，以阻止其在過程期間凝結。血液/抗凝血劑混合物經過離心機循環，以將周邊血樣品分離成MSC群，且自其他血液組分及血漿中分離單核細胞。系統將分離之MSC抽入收集袋中儲存，而其他血液組分及血漿返回至患者中。所用全部管組(tubing set)及針皆無菌，因此不存在疾病傳染風險。

可使用其他血液分離裝置，諸如描述於以下中之裝置：1998年3月3日頒予之美國專利第5,722,926號；1999年9月14日頒予之美國專利第5,951,877號；2000年4月25日頒予之美國專利第6,053,856號；2002年1月1日頒予之美國專利第6,334,842號；2004年7月1日申請之美國專利申請案第10/884,877號；美國專利7,201,848、美國專利6,022,306、美國專利6,589,526、美國專利申請案2008/0035585、US2008/0318756及2009/0104626，此等美國專利及專利申請案之每一者之全部揭示內容以引用的方式併入本文中。

本發明人已發現，宜調整血液析離術所用之血球比容範圍以增強所收集之細胞群的性質。舉例而言，在一實施例中，血球比容範圍經選擇可增加VSEL之比例。在另一實施例中，血球比容範圍經選擇可增強所收集之VSEL的超低溫保存，例如藉由使粒細胞之收集減至最少。在另一實施例中，血球比容範圍經選擇可確保同時收集多個幹細胞群，諸如VSEL及MSC。在一實施例中，血球比容範圍選擇為2-3%。在另一實施例中，血球比容範圍選擇為3-

4%。

鑑別MSC

如本文所揭示，可藉由FAC分選、以及使用光顯微術及CFU-F檢定之免疫選擇及表型分析鑑別MSC。僅舉例而言，可對培養板中或經EDTA分離之細胞之細胞離心(cytospin)製備物中的經萊特-吉姆沙(Wright-Giemsa)染色之細胞進行光顯微鏡檢查。組織化學染色可使用針對蘇丹黑(Sudan Black)、過碘酸-希夫染料(Periodic Acid-Schiff; PAS)、丁酸 α -萘基酯酯酶、酸性磷酸酯酶及鹼性磷酸酯酶之診斷套組(Sigma)藉由標準方案進行。

對於免疫螢光研究，MSC可用固定/滲透試劑(Cytoperm®, Serotech Ltd., Oxford, England)處理且用適當的游離單株抗體或經FITC結合之單株抗體(如本文所論述)標記且在Nikon顯微鏡上在使用汞氣燈的50 nm紫外線照明下加以偵測。

對於流動式細胞測量分析，經EDTA釋放之MSC或析離產物中之MSC可用純單株抗體或經FITC或PE結合之單株抗體染色。非特異性同型匹配抗體可用於測定背景螢光。可在FACScan流式細胞儀(Becton Dickinson, BD)上分析MSC且可根據此項技術中通常所知之程序用FACScan Lysis II(BD)研究軟體進行資料獲取。

以下單株抗體可用於偵測MSC：抗CD-45-FITC、抗CD14-PE、抗CD34-PE(Becton Dickinson)；抗膠原蛋白I、抗膠原蛋白III及抗纖維結合蛋白(fibronectin)(Sigma)；抗

膠原蛋白 VI(Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA)；抗 ICAM-1(CD54) 及 抗 VCAM-1(CD106)(R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA)。對照小鼠 IgG 1-PE、IgG 1-FITC、IgG 2a-PE 及 F(ab')₂-PE(Becton Dickinson)。單株抗體 SH-2(IgG 1) 及 SH-3(IgG 2b)(Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio., USA 或 Osiris Therapeutics, Inc.(Baltimore, Md., USA))。此等抗體識別 MSC 細胞表面上之抗原，但不能與 BM 源性 HSC 以及骨母細胞或骨細胞之細胞表面反應。

可藉由錐蟲藍(Trypan blue)經由染料排除(dye exclusion)來測試實質上純 MSC 群之任何所收集樣品的總細胞計數及細胞活力。亦可分析實質上純 MSC 群之樣品的表現細胞標記之細胞之存在性。

處理前、處理後及任何其他細胞樣品之總細胞計數及細胞活力可藉由血球計手工計數、流式細胞儀、或適於獲得細胞計數之其他手段，諸如 ViCell(Beckman Coulter)或適於對顯微影像上所顯示之細胞計數之軟體加以定量。

超低溫保存

在一些實施例中，藉由如本文揭示之方法獲得之實質上純人類 MSC 群可在液氮溫度下超低溫保存(例如冷凍)且長期儲存，從而在解凍時能夠使用。若經冷凍，則 MSC 將通常儲存於 10% DMSO、50% FCS、40% RPMI 1640 培養基中。人類 MSC 一經解凍，則可在生長因子及/或滋養層(feeder layers)存在下離體培養及擴增適當時段，隨後植入

有需要之個體中。

超低溫保存諸如MSC之幹細胞之方法通常為一般技術者所知，且揭示於美國專利申請案2008/0220520、2009/0022693、2008/0241113及2005/0106554及美國專利5,759,764及7,112,576及7,604,930中。

對於超低溫保存，可將藉由如本文揭示之方法獲得之實質上純MSC群懸浮於DPBS中，且可在冰上置放至少約15分鐘，為超低溫保存作準備。該準備過程可包括添加超低溫保存介質至實質上純MSC群中，接著利用控速冷凍器或其他合適冷凍系統(監測凍結(dump-freeze)之冷凍系統或冷凍容器(Nalgene))，對混合物執行若干降溫步驟，以使實質上純MSC群之溫度降低至約-90°C的最終溫度。合適控速冷凍器包括(但不限於)Cryomed Thermo Forma控速冷凍器7454(Thermo Electron, Corp.)、平面控速冷凍器Kryo 10/16(TS Scientific)、Gordinier、Bio-Cool--FTS Systems、及Asymptote EF600、BIOSTOR CBS 2100系列。

可製備包含培養基及DMSO之超低溫保存介質。可將約3 ml DPBS添加至容器(諸如50 ml圓錐形管)中。可向約3 ml DPBS中添加約1 ml人類血清白蛋白(HSA)至，接著在冰上冷卻約10分鐘。向HSA及DPBS中添加約1 ml經冷卻99% DMSO，以製備最終超低溫保存介質。超低溫保存介質及實質上純MSC群樣品可接著在冰上置放約15分鐘，隨後添加超低溫保存介質至細胞樣品中。採用分批處理法，將超低溫保存介質等分加至細胞樣品中。舉例而言，可取一等

份約100 μ l實質上純MSC群之懸浮液與約3 ml DPBS、1 ml HSA及約1 ml 99% DMSO合併。可取2等份約200 μ l MSC細胞懸浮液與約6 ml DPBS、2 ml HSA及約2 ml 99% DMSO合併。可取約5等分細胞樣品與約15 ml DPBS、約5 ml HSA及約5 ml 99% DMSO合併。可取約10等分細胞樣品與約30 ml DPBS、約10 ml HSA及約10 ml 99% DMSO合併。

在一替代性實施例中，可使用其他超低溫保存介質。舉例而言，含有超低溫保存劑之超低溫保存介質(諸如CryoStor CS10或CS5(Biolife)、補充有丙二醇及蔗糖之胚胎超低溫保存介質(Vitrolife)、或SAGE介質(Cooper Surgical))可用於維持解凍後之高細胞活力結果。甘油可與其他超低溫保存劑(諸如DMSO)一起使用或可依約10%之濃度，單獨用於含有合適蛋白質之介質中。

超低溫保存介質可添加至實質上純MSC細胞群樣品中。超低溫保存介質可逐滴添加至懸浮有實質上純MSC群之DPBS中，直至所懸浮之經血幹細胞與超低溫保存介質之總混合物體積達到超低溫保存細胞混合物之最終所要體積。最終超低溫保存細胞介質可轉移至2×5 ml有條碼之冷凍瓶(cryoquat)中，其中QC樣品儲存在5 ml小瓶之瓶蓋中。使用移液器取出約200 μ l等分樣品，且等分加至QC瓶蓋中。在填滿瓶蓋之後，將剩餘4.8 ml試樣添加入5 ml小瓶中。樣品應送去進行傳染病分析及其他分析。冷凍小瓶應置放於CRYOMED冷凍器中且經控速降溫至約-85°C或低

於-85℃之溫度。超低溫保存之試樣應轉移至儲槽(bunker)中，以在-150℃或低於-150℃的液氮蒸汽中儲存。對傳染病測試呈陽性之任何樣品皆應檢疫。對傳染病測試呈陰性之任何樣品可轉移至不同永久儲槽中。

以下降溫步驟可於控速冷凍器中加以程式化：首先使超低溫保存劑與經血幹細胞之混合物降溫。與超低溫保存劑合併之經血幹細胞可經受控速降溫以為最終儲存於冷凍器中作準備。控速降溫經設計可維持細胞活力。Cryo-Med冷凍器(Thermo Electron Corp.)、液氮鋼瓶及攜帶型Cryo-Med冷凍器可用於控速降溫以為最終儲存於冷凍器中作準備。細胞可於冷凍小瓶或冷凍袋中經受控速降溫以達到約-90℃之溫度。

對於收集於冷凍袋中之實質上純MSC群樣品，細胞可經受以下控速降溫概況：在約4℃下等待、以每分鐘1.0℃至-6.0℃(樣品)、以每分鐘25.0℃降至-50.0℃(腔室)、以每分鐘10.0℃降至-14.0℃(腔室)、以每分鐘1.0℃降至-45.0℃(腔室)、以每分鐘10.0℃降至-90.0℃(腔室)、及結束(樣品在-85.0℃下或低於-85.0℃下)。

對於收集於冷凍小瓶中之實質上純MSC群樣品，細胞可經受以下控速降溫概況：在4.0℃下等待、以每分鐘1.0℃降至-3.0℃(腔室)、以每分鐘10.0℃降至-20.0℃(腔室)、以每分鐘1.0℃降至-40.0℃(腔室)、以每分鐘10.0℃降至-90.0℃(腔室)、及結束。

一旦超低溫保存劑與經血幹細胞之混合物處於約-85℃

或低於 -85°C ，即將超低溫保存小瓶轉移至極冷儲存裝置(storage unit)中且在約 -135°C 或低於 -135°C 溫度的液氮蒸汽中儲存，或者，小瓶可儲存於液氮之液相中。舉例而言，適合的極冷儲存裝置包括(但不限於)LN2冷凍器MVE 1830(Chart Industries)。

亦可藉由流動式細胞測量術分析實質上純MSC群之新鮮樣品及先前超低溫保存之實質上純MSC群的解凍樣品以分析細胞表面標記、細胞活力、及其他細胞特徵。亦可根據以下方案在細胞溶解之後分析實質上純MSC群之新鮮樣品。

超低溫保存之MSC必須根據本文所述之解凍方法解凍。在MSC細胞樣品必須解凍之情況下，實質上純MSC群可能需要解凍之後或在培養細胞之後即刻進行流動式細胞測量術分析以評估某一細胞傳代。超低溫保存之樣品可於 37°C 水浴中攪拌，而不讓細胞完全解凍。細胞可轉移入約1 ml冷卻洗滌介質中且藉由倒置加以混合。樣品可在約2000 rpm下離心約7分鐘。可移除上清液且將細胞再懸浮於約100 μl 洗滌介質(25% HSA、DNAse、肝素及HBSS w/ Ca^{+} 及 Mg^{+})中。再懸浮之細胞可接著於血庫血清離心機(Blood Bank Serofuge)中離心約1分鐘。可傾析上清液且將細胞再懸浮於約1.2 ml鞘液(Sheath fluid)中並加以渦旋。

中期至長期儲存所有或一部分藉由如本文揭示之方法獲得之人類MSC(諸如中期或長期儲存於細胞庫中)亦在本發明的範疇內。細胞於細胞庫中之此中期至長期儲存揭示於

美國專利申請案第2003/0054331號及專利申請案第WO03/024215號中，且該等專利以全文引用的方式併入本文中。在處理結束時，如本文揭示之人類MSC可裝載入諸如注射器之傳遞裝置中以藉由一般技術者所知之任何手段置放入接受者個體中。

在一些實施例中，藉由如本文揭示之方法獲得之人類MSC可視情況在適合介質存在下包裝於適合容器中。在一些實施例中，包裝進一步包含用於所要目的之書面說明書，諸如將人類MSC植入個體中以改善或治療疾病之方法（及視情況存在之儲存方法及/或解凍方法（若經超低溫保存）），或用於再生醫學或療法之治療方案之書面說明書。

治療方法

如本文揭示之一態樣係關於治療需要增加幹細胞（諸如MSC）數目之個體的方法。在一些實施例中，個體預定或意欲捐獻諸如MSC之幹細胞用於例如異源或自體移植。一般而言，方法包括向需要此治療或已確定需要此治療之個體投與治療有效量之如本文所述的調動劑，諸如GM-CSF或G-CSF。為治療此等個體而投與治療有效量之如本文所述之調動劑（諸如G-CSF或GM-CSF）為期至少2天或至少3天但至多4天將使周邊血中之MSC數目及/或頻率增加。在一些實施例中，此投藥將使周邊血中之MSC數目增加約10-500倍。量測此等增幅之方法在此項技術中已知，其揭示於本文中，且參見例如Neben等人，Blood. 1993; 81(7):1960-7；Ashihara等人Exp. Hematol. 2000;

28(3):311-7 ; Pruijt 等人 , Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999; 96(19):10863-8。

諸如 G-CSF 或 GM-CSF 之調動劑之劑量、毒性及治療功效可藉由標準醫藥程序，例如用於測定 LD50(群體 50%致死劑量)及 ED50(群體 50%治療有效劑量)之標準醫藥程序，於例如細胞培養物或實驗動物中加以確定。毒性效應與治療效應之間的劑量比率為治療指數且其可表示為比率 LD50/ED50。展現高治療指數之調動劑(諸如 G-CSF 或 GM-CSF)較佳。儘管可使用展現毒副作用之化合物，但應慎重設計可使此等化合物靶向受影響組織之位點的傳遞系統以使對未感染細胞之潛在損傷最小化且藉此降低副作用。

自細胞培養檢定及動物研究獲得之資料可用於確定供人類使用的劑量範圍。此等化合物之劑量較佳在包括具有少許或不具有毒性之 ED50 之循環濃度的範圍內。視所用劑型及所用投藥途徑而定，劑量可在此範圍內變化。本發明方法所用之任何化合物的治療有效劑量初始皆可利用細胞培養檢定估計。劑量可在動物模型中確定以獲得循環血漿濃度範圍，其包括如細胞培養中所測定之 IC50(亦即達成症狀之半數最大抑制之測試化合物濃度)。此資訊可用於更準確確定適用於人類之劑量。血漿中之含量可藉由例如高效液相層析量測。

根據本發明之另一態樣，提供在其他臨床程序之前/期間將 MSC 作為單一藥劑自某一組織調動至另一組織中之方法。此等細胞包括非造血正常細胞且在其生命週期中之至

少一個分化階段期間具有經歷活體內調動/遷移的潛能。

根據本發明之另一態樣，提供藉由輸注有效量之調動劑(諸如 GM-CSF 或 G-CSF)而在收集待用於器官移植之組織之前及期間調動 MSC 的方法。在一些實施例中，本發明亦提供使用諸如 GM-CSF 或 G-CSF 之離體調動劑將 MSC 從已自個體收集之離體器官或周邊血樣品調出的方法。此包括例如在自個體收集 PB 源性或 BM 源性 MSC 之前，活體內灌注來自合法死亡器官供者之活體內周邊血。

在一實施例中，向個體投與有效量之調動劑，諸如 G-CSF 或 GM-CSF，以調動該個體之周邊血中之 BM 源性 MSC。在另一實施例中，向個體投與有效量之調動劑，諸如 G-CSF 或 GM-CSF，以調動該個體之周邊血中之 PB 源性 MSC。在另一實施例中，使有效量之之調動劑(諸如 G-CSF 或 GM-CSF)與個體之周邊血樣品接觸以離體調動周邊血中之 PB 源性 MSC。「有效量」為足以實現周邊血中之 MSC 數目及/或頻率顯著增加的量。有效量可以一或多次投藥、用藥或給藥投與。調動劑之治療有效量視所選調動劑(例如 G-CSF 或 GM-CSF)而定。諸如 G-CSF 或 GM-CSF 之調動劑可每天投與一或多次至每週投與一或多次；包括每隔一天一次。熟習此項技術者將瞭解某些因素可能影響為有效治療個體所必需之劑量及時序，該等因素包括(但不限於)先前治療、個體之綜合健康及/或年齡、及存在之其他疾病。此外，用如本文所述之治療有效量之 G-CSF 或 GM-CSF 治療個體可包括單一治療或一系列治療。

在一些實施例中，本文所述之治療方法包括投與另一種調動劑，例如選自由以下組成之群但不限於以下之藥劑：介白素-17(IL-17；Journal of Immunol. 2001; 167: 2081-2086)、AMD3100(Flomenberg等人，Acta Haematol. 2005; 114(4):198-205)、環磷醯胺(Cy)、歐洲紫杉醇及(DXT)(Ojeifo等人，Experimental Hematology 2000; 28:451-459)。

在一些實施例中，方法包括向個體投與PB源性MSC或BM源性MSC或其分化子代，例如將細胞再引入同一個體中或將細胞移植入第二個體(例如HLA型匹配之第二個體)中。

在一些實施例中，可使用PB源性MSC或BM源性MSC有效治療之個體包括可通常用骨髓或幹細胞移植物治療之任何個體，例如患有癌症，例如神經母細胞瘤(neuroblastoma)(產生於不成熟神經細胞中且主要影響嬰兒及兒童之癌症)、骨髓發育不良(myelodysplasia)、骨髓纖維化(myelofibrosis)、乳癌、腎細胞癌或多發性骨髓瘤之個體。舉例而言，PB源性MSC或BM源性MSC可移植入患有對放射療法或化學療法治療具有抗性之癌症的個體中，以例如恢復用於治療癌症之高劑量化學療法及/或放射療法所破壞的幹細胞。

在一些實施例中，MSC可接著於血庫血清離心機中離心約1分鐘。可傾析上清液且將細胞再懸浮於約1.2 ml鞘液中並加以渦旋。

中期至長期儲存所有或一部分藉由如本文揭示之方法獲得之MSC群或實質上純MSC群(諸如中期或長期儲存於細胞庫中)亦在本發明的範疇內。細胞於細胞庫中之此中期至長期儲存揭示於美國專利申請案第2003/0054331號及專利申請案第WO03/024215號中，且該等專利以全文引用的方式併入本文中。在處理結束時，如本文揭示之MSC群或實質上純MSC群可裝載入諸如注射器之傳遞裝置中以藉由一般技術者所知之任何手段置放入接受者個體中。在一些實施例中，使用如本文揭示之方法獲得之MSC群可懸浮於適於輸注入個體中之短期儲存介質中，諸如美國專利5,955,257中揭示之介質，該專利以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，使用如本文揭示之方法收集並富集之MSC可經儲存(例如供供者(例如同種異體)或另一個體未來治療使用)或直接移植，例如用於促進手術後癒合。

在本發明之一態樣中，藉由如本文揭示之方法收集之複數個MSC可進一步分選成至少2個亞群，其可分別或一起(例如含於同一小瓶中)超低溫保存。在一些實施例中，至少2個MSC亞群可為2個不同MSC亞群。舉例而言，MSC可分選成至少2個細胞亞群，例如(但不限於)(1)幹細胞群或富含MSC群及(2)非幹細胞群或MSC排除群。此外，亦設想2個亞群(亦即以上(1)及(2))可一起超低溫保存。在一些實施例中，MSC分為亞群之此分選可為陽性或陰性分選或其組合。

在一些實施例中，細胞表面蛋白標記可用於正向選擇或

負向選擇或移除幹細胞。此等標記之實例在此項技術中已熟知且展示於表1中：

表1	
細胞類型	標記
造血幹細胞(HSC)	CD34 ⁺ 、CD45 ⁺ 、CXCR4 ⁺
內皮祖細胞	CD34 ⁺ 、CD45 ⁺ 、CD133 ⁺ 、KDR ⁺
極小胚胎樣細胞(VSEL)	CD34 ⁺ 、CD133 ⁺ 、CXCR4 ⁺ 、SSEA4 ⁺
間質幹細胞(MSC)	CD34 ⁻ 、CD45 ⁻ 、CD90 ⁺ 、CD105 ⁺ 、CD106 ⁺ 、CD44 ⁺

在一些實施例中，藉由如本文揭示之方法獲得之MSC群或實質上純MSC群可視情況在適合介質存在下包裝在適合容器中。在一些實施例中，包裝進一步包含用於所要目的之書面說明書，諸如將MSC或實質上純MSC群植入個體中以改善或治療疾病之方法(及視情況存在之儲存方法及/或解凍方法(若經超低溫保存))，或用於再生醫學或療法之治療方案之書面說明書。

用於自體細胞療法之MSC：

在本發明之一實施例中，藉由如本文揭示之方法自個體之經調動之周邊血收集的MSC在該個體需要此細胞療法(例如自體細胞療法)時可引入或移植回至個體中。在一些實施例中，MSC可單獨或與其他細胞組合用於再生療法中之未來自體治療應用，諸如創口癒合、心臟修復及骨修復及其他矯形適應症，如本文在實例中所揭示。在一些實施例中，藉由如本文揭示之方法自個體之經調動之周邊血收

集的MSC可用於修復或治療眼病，諸如視網膜病或黃斑變性，如Vossmerbaeumer等人，Cytotherapy, 2009; 11; 177-188中所論述，該文獻以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，藉由如本文揭示之方法自個體之經調動之周邊血收集的MSC可分化成任何數目之起源於中胚層的不同細胞類型，包括脂肪細胞、骨母細胞及軟骨細胞，如Musina等人，Cell Technologies in Biology and Medicine, 2006; 2;147-151中所論述，該文獻以全文引用的方式併入本文中。植入MSC以治療心血管病症及其他病症之方法為一般技術者所熟知，且揭示於國際專利WO 2008/054819及美國專利6,387,369、7514074、6,174,333及6,225,119及美國專利申請案2009/0214493中，該等專利以全文引用的方式併入本文中。

在本發明之一實施例中，自個體經調動之周邊血獲得之MSC可用於個人化醫學應用，諸如自體治療性用途，以及用於個人化檢定中以評估個人飲食、藥物遺傳學、神經化學品、生活方式對MSC功能及活力之影響。

包含一部分或所有藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC之MSC組合物可用於經由增補(augmentation)受損組織來修復、治療或改善各種美觀或功能性病狀(例如缺陷)。藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC為重建或增補受損組織提供重要資源。在一實施例中，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC可用於組織工程改造及再生醫學中以置換已由發

育缺陷、損傷、疾病或老化磨損損壞的身體部分。藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC提供其中MSC可分化成不同細胞且產生相同個體之特定譜系或基因型的獨特系統。因此，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC提供個別化幹細胞療法之顯著優點。

此外，在不存在疾病或損傷之情況下，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的此等MSC及其組合物可藉由向軟組織區域、裂口、凹陷或空隙中添加主體(諸如用於「修平」來用於增補與損傷無關之軟組織。本發明亦包括多次及連續投與藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC。

對於基於幹細胞之治療，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群體較佳自自體來源收集。接著如本文所述製備並分離MSC組合物，且特定言之，與存在於經調動之周邊血中之其他幹細胞群分離。為了根據本發明將藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC及/或其組合物引入或移植入人類或動物接受者中，製備單核細胞之懸浮液。單核細胞懸浮液含有MSC之濃縮物，且可與存在於周邊血中之其他幹細胞分離，且收集MSC並再懸浮於生理學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑中。或者，MSC懸浮物可含於無血清無菌溶液(諸如超低溫保存溶液)中。在一些實施例中，亦可使用富含MSC之製劑。在一些實施例中，MSC懸浮液可接著經由例如注射引入供者組織之一或多個部位中。

經濃縮或經富集之幹細胞可以含有生理學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑之醫藥學上或生理學上可接受的製劑或組合物形式投與，且投與相關接受者有機體(包括人類及非人類動物)之組織。可藉由將細胞再懸浮於適合液體或溶液(諸如無菌生理鹽水或其他生理學上可接受之可注射水性液體)中來製備含有MSC之組合物。此等組合物中各組分之使用量可由熟習此項技術者以常規方式確定。

在一些實施例中，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群體或其組合物可如下投與：將幹細胞懸浮液置放於吸收性或黏著性材料(亦即膠原蛋白海綿基質)上且將含有MSC之材料插於相關部位中或相關部位上。或者，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群體可藉由非經腸注射途徑(包括皮下、靜脈內、肌肉內及胸骨內注射)投與。其他投藥模式包括(但不限於)鼻內、鞘內、皮內、經皮、經腸及舌下投藥。在一實施例中，藉由如揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群體可藉由內窺鏡手術投與。

對於可注射投藥，包含藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC之組合物可懸浮於無菌溶液或懸浮液中或可再懸浮於醫藥學上及生理學上可接受之水性或油性媒劑中，其可含有防腐劑、穩定劑及使溶液或懸浮液與接受者之體液(亦即血液)等張之物質。適用之賦形劑之非限制性實例包括水、磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.4)、0.15 M氯化鈉水溶液、右旋糖、甘油、稀乙醇及其類似物、及其混合

物。說明性穩定劑為可單獨或混合使用之聚乙二醇、蛋白質、醣、胺基酸、無機酸及有機酸。用量或數量以及所用投藥途徑視個體而定，且相當於熟習此項技術者所知之類似服用類型或適應症中所使用的量。

依照本發明，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群體可投與身體組織，包括上皮組織(亦即皮膚、內腔等)、肌肉組織(亦即平滑肌)、血液、腦及各種器官組織，諸如與泌尿系統相關之彼等器官(亦即膀胱、尿道、輸尿管、腎等)。

根據本文所述之一般治療方法，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群體可包含其他細胞(例如包含目標幹細胞群之細胞部分)且可投與個體，例如藉由靜脈內(i.v.)導管輸注入個體之血流中(類似於任何其他靜脈內流體)。或者，然而，可產生MSC群之個別化混合物，以諸如提供特定用於個體之治療需要的細胞療法混合物。諸如經由析離方法獲得之全面細胞混合物可經表徵、分選且分離成不同細胞群。細胞標記(諸如VSEL、MSC及HSC標記)或組織特異性標記可用於在表型上表徵自周邊血收集之細胞群。使用此等標記，有可能基於細胞類型進行分離及分選。從而將細胞混合物轉變成細胞群，其可大致分成兩部分：幹細胞部分及非幹細胞部分。非幹細胞部分可進一步分成祖細胞或纖維母細胞部分及功能細胞或完全分化細胞部分。周邊血細胞混合物一經分選，即可將MSC群及非幹細胞部分分別超低溫保存及儲存。以此方式，可產

生來自個體之不同細胞群之集合庫或儲存庫。或者，MSC群及非幹細胞部分可一起超低溫保存，接著在使用之前分選及分離。

在一些實施例中，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群體可用於產生或分化成某一細胞類型之任何群體，其由胚層(亦即內胚層、中胚層及外胚層)發育而成。此等細胞包括(但不限於)分化細胞、神經祖細胞或分化細胞、神經膠質祖細胞或分化細胞、寡樹突神經膠質細胞祖細胞或分化細胞、皮膚祖細胞或分化細胞、肝祖細胞或分化細胞、肌肉祖細胞或分化細胞、骨祖細胞或分化細胞、間質幹細胞或祖細胞、胰臟祖細胞或分化細胞、祖細胞或分化軟骨細胞、基質祖細胞或分化細胞、培養擴增之幹細胞或祖細胞、經培養之分化幹細胞或祖細胞、或其組合。亦關注祖細胞，諸如造血、神經、基質、肌肉(包括平滑肌)、肝、肺、胃腸及間質祖細胞。亦關注已分化之MSC群，諸如分化成細胞，諸如(但不限於)骨母細胞、肝細胞、粒細胞、軟骨細胞、肌細胞、脂肪細胞、神經元細胞、胰臟細胞、或其組合及混合物。

在一些實施例中，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群可組合、重組或混配成適於治療個體疾病及/或特定組織再生的細胞療法細胞混合物。藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群體與組織特異性祖細胞及視情況存在之功能細胞的組合可用於例如增強所移植之MSC的嫁接性。

因此，在一實施例中，本發明提供使用藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群之自體混合物的方法及產品。此MCS群可單獨或與其他適用細胞組合使用。在一些實施例中，MSC可與得自周邊血之其他幹細胞、或其他功能適用非幹細胞組合。

因此，個體MSC可單獨或經選擇性重組(定製混合)用於再生療法中之個別化自體治療應用。換言之，自體MSC群可與其他細胞(包括幹細胞，諸如得自周邊血之其他非MSC幹細胞)選擇性組合以用於自體細胞療法。在一些實施例中，混合MSC群可包含約10%至約90%之藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC、約10%至約80%、或約10%至約60%、或約10%至約40%、或約10%至約90%之藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC。在一些實施例中，MSC群亦可包含非幹細胞(例如功能細胞)及/或亦得自周邊血之不為MSC之幹細胞的群體，諸如約5%至約50%功能細胞及/或非MSC幹細胞、約5%至約40%功能細胞及/或非MSC幹細胞、約5%至約30%功能細胞及/或非MSC幹細胞、約5%至約20%功能細胞及/或非MSC幹細胞、或約5%至約10%功能細胞及/或非MSC幹細胞。

上述細胞療法產品之一適合實例為HSC與MSC或造血系統之其他功能細胞的自體混合物。另一實例為包含自體MSC群與其他細胞混合的細胞療法產品，該等其他細胞諸如以下細胞類型中之至少一者或任何組合：HSC、PBSC、

心肌祖細胞及視情況存在之心肌細胞。

因此，在另一實施例中，提供治療有需要之患者之方法，其包含向個體投與單獨或組合(分別或混合)之藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群之自體混合物。

幹細胞儲藏(Banking)

在本發明之另一態樣中，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群可儲存於細胞庫中以支持任選健康照護保險模型，從而有效保護群體成員防止未來疾病。當個別個體處於健康狀態時，其可選擇處理及保藏自周邊血收集之其自身幹細胞群以用於未來其健康照護需要之配給(distribution)。

因此，在一實施例中，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的MSC群「儲藏」在幹細胞庫或寄存處或儲存設施、或為保管而保存目標幹細胞群之任何地方以供未來使用。儲存設施可以倘若發生諸如核攻擊之災難性事件，藉由如本文揭示之方法自個體之周邊血收集的目標幹細胞群得以保持安全的方式加以設計。在一些實施例中，儲存設施可在地下，洞中或地窖中。在其他實施例中，其可在山之側面或在外太空中。儲存設施可嵌埋於諸如鉛之遮蔽材料中。

根據另一實施例，提供具有4步驟幹細胞儲藏方法。步驟A包括向個體投與一或多種調動劑以增加該個體之周邊血中之MSC群的量。步驟B包括藉由如本文揭示之方法自

周邊血收集MSC群，其中該個體無即刻感知之健康病狀，例如無其中個體需要使用其自身目標幹細胞群進行其自體移植來治療的病狀。步驟C包括以保藏之細胞群形式保藏藉由如本文揭示之方法自周邊血收集的MSC群。步驟D包括取得藉由如本文揭示之方法收集之保藏MSC群以將MSC群自體移植入個體中。

將詳細參考本發明之實施例，其實例在一些隨附圖式中加以說明。在本發明之一些實施例中，包括使用Lakewood, Colorado之Gambro BCT, Inc.所製造之Elutra®離心機自經調動之血液中分離MSC。儘管本發明之實施例係聯合Elutra®離心機描述，但此提及僅出於例示性目的且不意欲在任何意義上限制本發明。應瞭解本發明之實施例可使用其他離心機，包括(但不限於)亦由Gambro BTC Inc.製造之COBE® Spectra析離系統、Trima®系統及Trima Accel®系統、以及用於分離血液組分之其他淘洗裝置。

MSC用於個人化醫學診斷及預後性檢定之用途。

本發明之另一態樣係關於得自個體經調動之周邊血之MSC的用途，其用於個人化醫學應用，諸如自體治療性用途，以及用於個人化檢定中以評估個人飲食、藥物遺傳學、神經化學品、生活方式對MSC功能及活力之影響。此等檢定當前在此項技術中已熟知，且包括其中使化合物、藥劑或環境刺激物與MSC接觸之高產量篩檢，且可量測化合物、藥劑或環境刺激物對MSC功能(例如分化潛力、增殖、存活)及活力之影響，且結果與參考對照樣品(例如不

存在化合物，或陽性對照樣品，諸如存在BMP6及其類似物)比較。

在本發明之一態樣中，自個體獲得之MSC群體可用於高產量篩檢中以評估個體對藥劑(諸如對特定藥物、激素治療或醫藥或療法)之個別反應。簡言之，使MSC細胞群與相關藥劑接觸，且藉由監測輸出參數(諸如標記表現、細胞活力、分化特徵、多能能力及其類似參數)對藥劑作用進行評估。MSC可使用如本文揭示之方法新鮮分離，或在一些實施例中，在用於檢定中之前經培養、超低溫保存或遺傳工程改造。在一些實施例中，個體MSC可為純系培養物之環境誘導變異體：例如分裂成獨立培養物且在獨特條件(例如有或無病毒；存在或不存在其他細胞激素或其組合)下生長。

重要的是，因為MSC對於個體遺傳組成而言具有特異性，所以MSC之使用提供對MSC進行藥物遺傳分析之工具。舉例而言，個體MSC可具有會導致獨特病理性特徵之特定變異體。舉例而言，因為MSC來自於個體(例如自體)，所以其具有所要病理性特徵，例如造成疾病病變或導致對治療藥物之反應不良或增強之突變及/或多形現象。因此，藉由如本文揭示之方法獲得之MSC可用於評估個體對特定化合物、藥劑之MSC反應且在一些情況下此可適用於疾病之預後。在該實施例中，本發明方法可用於篩檢緩和病變之藥劑、或正面影響MSC增殖或功能之藥劑。

在替代性實施例中，本發明方法可用於篩檢相較於來自

其他個體之MSC(例如無突變及/或多形現象)，引起個體之不同MSC反應(歸因於固有遺傳組成或特定突變及/或多形現象)之藥劑，因此該等方法可用於例如評估相較於其他人及/或MSC細胞，特定藥物及/或藥劑對個體MSC群體之影響，因此充當個人化醫學及/或藥物遺傳學之高產量篩檢。MSC對藥劑(特定言之，藥理學藥劑)反應之方式(包括反應時序)為細胞生理狀態之重要反映。

參數為MSC之可定量組分，特定言之，宜於高產量系統中準確量測之組分。參數可為任何細胞組分或細胞產物，包括細胞表面決定子(determinant)、受體、蛋白質或其構形或轉譯後修飾形式、脂質、碳水化合物、有機或無機分子、核酸(例如mRNA、DNA等)、或來源於該種細胞組分之一部分、或其組合。儘管大多數參數將提供定量讀數，但在一些情況下，半定量或定性結果可接受。讀數可包括單一測定值，或可包括平均值、中位值或偏差等。利用許多相同檢定將獲得各參數之參數讀數值之特徵性範圍。預期存在可變性(Variability)且將使用標準統計方法及用於提供單一值之常見統計方法獲得各測試參數組之值範圍。

包括候選藥劑之化合物係自廣泛多種來源(包括合成或天然化合物之集合庫)獲得。舉例而言，眾多手段可用於隨機及定向合成廣泛多種有機化合物，包括生物分子，包括表現隨機化寡聚核苷酸及寡肽。或者，呈細菌、真菌、植物及動物萃取物形式之天然化合物集合庫可利用或容易產生。另外，天然或合成產生之集合庫及化合物容易經由

習知之化學、物理及生物化學手段修飾且可用於產生組合集合庫。可對已知藥理學藥劑進行定向或隨機化學修飾，諸如醃化、烷基化、酯化、醃胺化等，以產生結構類似物。

針對藥劑對幹細胞群的影響來篩檢藥劑，此係藉由將藥劑(通常連同缺乏藥劑之細胞一起)添加至至少一個且通常複數個幹細胞樣品中。量測對藥劑有反應之參數變化，且藉由與參考培養物(例如在藥劑存在及不存在下，用其他藥劑獲得等)比較來評估結果。

在一些實施例中，藥劑宜以溶液形式或易溶形式添加至培養中之幹細胞的培養基中。藥劑可以呈間歇或連續流形式之流過式系統(flow-through system)添加，或者，逐一或遞增添加化合物之大丸劑至另外靜止之溶液中。在流過式系統中，使用兩種流體，其中一種流體為生理學上中性溶液，且另一種流體為與所添加之測試化合物相同之溶液。第一流體及第二流體依次越過幹細胞。在單一溶液方法中，添加測試化合物之大丸劑至包圍細胞之一定體積的培養基中。培養基組分之總濃度不應隨大丸劑添加而顯著變化，或在流過式方法中，不應在兩種溶液之間顯著變化。在一些實施例中，藥劑調配物不包括可對總調配物具有顯著影響之其他組分，諸如防腐劑。因此，較佳調配物基本上由生物活性化合物及生理學上可接受之載劑(例如水、乙醇、DMSO等)組成。然而，若化合物為無溶劑液體，則調配物可基本上由化合物自身組成。

複數個檢定可以不同藥劑濃度平行操作以獲得對各種濃度之差異反應。如此項技術中所知，通常使用依1:10或其他對數尺度、稀釋度產生的一系列濃度確定藥劑的有效濃度。必要時，濃度可用第二系列之稀釋度進一步改進。通常，此等濃度之一充當陰性對照，亦即處於零濃度或低於藥劑偵測含量或處於或低於不產生可偵測之表型變化之藥劑濃度。

視情況，用於篩檢之個體MSC可經操作以表現所要基因產物，以例如賦予MSC所要生理特徵及/或修復或置換MSC之遺傳組成中之不合需要的突變及/或多形現象。因此，在個體MSC自體移植回個體中之前，對個體MSC離體進行此基因療法。在一些實施例中，MSC可經遺傳修飾以置換基因產物或添加或抑制基因產物。在一些實施例中，遺傳工程改造可促進組織再生、治療疾病或改良MSC在植入個體中之後的存活(亦即防止排斥)。用於轉染細胞之技術在此項技術中已知。

若干細胞用於自體移植之目的，則熟習此項技術者可設想眾多基因可向經轉染之個體間質細胞傳送有益性質。在一些實施例中，視基因及實施例而定，所添加之基因可最終保留在接受者MSC及所有其子代中，或可僅短暫保留。舉例而言，編碼血管生成因子之基因可轉染入自周邊血分離之MSC中。當MSC用於分化成心肌細胞及修復心肌時，此等基因將適用於誘導側血管形成。在一些情形下，可能需要用一種以上基因轉染細胞。

在一些情況下，需要使基因產物分泌。在此等情況下，基因產物較佳含有促進蛋白質分泌之分泌信號序列。舉例而言，若所要基因產物為血管生成蛋白，則熟習此項技術者可選擇具有天然信號序列之血管生成蛋白，例如 VEGF，或可使用常規遺傳操作(參見 Nabel 等人，1993)修飾基因產物以含有該種序列。

在本發明之一實施例中，自個體經調動之周邊血獲得之 MSC 可以個別化檢定形式用於研究及瞭解個體 MSC 生長及分化之信號傳導路徑。使用本發明之個體 MSC 適用於幫助開發用於先天性及成人心臟衰竭之治療應用。使用本發明之此等個體 MSC 能夠對特定分化成不同譜系(例如成骨譜系、心臟譜系)進行研究，而不需要複雜、耗時的動物模型。在另一實施例中，個體 MSC 可經遺傳修飾以攜帶特定疾病及/或特定疾病或病症之病理性性狀及表型。

在一實施例中，檢定包含複數個本發明之個體 MSC 或其分化子代。在一實施例中，檢定可用於研究個體 MSC 之分化路徑，例如(但不限於)沿心肌細胞譜系、平滑肌譜系、內皮譜系及此等譜系之亞群之分化。

在另一實施例中，檢定可用於研究個體 MSC 之病理性特徵，例如疾病及/或與疾病或病症相關之遺傳特徵。在一些實施例中，疾病或病症為創口癒合病症、骨病症或心血管病症或疾病。在一些實施例中，個體 MSC 已經遺傳工程改造以包含與疾病或病症相關之特徵。遺傳工程改造個體 MSC 之此等方法為熟習此項技術者所熟知，且包括藉助於

轉染(例如(但不限於)使用病毒載體轉染)或藉由此項技術中已知之其他手段將核酸引入細胞中。

在一些實施例中，個體MSC可易於於提供靶向譜系分化以及純系均質性之優點且能夠操作外部環境之實驗系統中加以操作。此外，因為以實驗方式改變人類生殖系在倫理上不可接受，所以ES細胞轉殖基因途徑不可為包括操作人類基因之實驗所用。本發明之人類個體MSC中之基因靶向允許其中系統因倫理問題而不能活體內測試之領域中的重要應用，且可適當重演彼特定個體之人類生物學或疾病過程。

在另一實施例中，本發明之個體MSC可用於製備相對而言未經優先表現於其他譜系之細胞中之cDNA污染的cDNA集合庫。

本發明之個體MSC亦可用於製備對心肌細胞及其前驅體之標記具有特異性的抗體。多株抗體可藉由以免疫原性形式之本發明細胞注射脊椎動物加以製備。單株抗體之產生描述於諸如美國專利第4,491,632號、第4,472,500號及第4,444,887號、及Methods in Enzymology 73B:3 (1981)之標準參考文獻中。特異性抗體分子亦可藉由使免疫勝任細胞或病毒粒子之集合庫與目標抗原接觸且長出經正向選擇之純系來產生。參見Marks等人，New Eng. J. Med. 335:730, 1996及McGuinness等人，Nature Biotechnol. 14:1449, 1996。另一替代方案為將隨機DNA片段再裝配入抗體編碼區域中，如EP專利申請案1,094,108 A中所述。

抗體又可用於自混合細胞群中鑑別或補救(例如恢復表型)具有所要表型的細胞，以達成諸如在使用組織樣品之免疫診斷期間共染色、及使前驅細胞與末期分化個體MSC及其他譜系之細胞分離的目的。

在另一實施例中，個體MSC可用於檢查在本發明之個體MSC之分化期間及之後的基因表現概況。所表現之基因組可與如此項技術中已知之來自不同個體或對照MSC樣品之其他MSC亞群進行比較。可使用此項技術中已知之用於偵測特定mRNA之任何適合定性或定量方法。mRNA可藉由例如與微陣列雜交、於組織切片中原位雜交、藉由逆轉錄酶-PCR、或於含有poly A+ mRNA之北方墨點中加以偵測。熟習此項技術者可容易使用此等方法確定兩個樣品之間的mRNA轉錄物之分子尺寸或分子量差異。

任何適用於偵測及比較樣品中之mRNA表現量之方法皆可聯合本發明方法使用。舉例而言，樣品中之mRNA表現量可藉由自樣品產生經表現之序列標籤(EST)之集合庫加以測定。集合庫內EST之相對表現度(relative representation)之列舉可用於估計起始樣品內基因轉錄物之相對表現度。測試樣品之EST分析之結果可接著與參考樣品的EST分析相比較以確定所選聚核苷酸(特定言之，對應於本文所述之一或多種經差異表現之基因的聚核苷酸)的相對表現量。

或者，測試樣品中之基因表現可使用基因表現連續分析(SAGE)方法(Velculescu等人，Science (1995) 270:484)進

行。簡而言之，SAGE包括自各轉錄物內之特定位置分離短獨特序列標籤。序列標籤可經串聯、選殖及定序。起始樣品內之特定轉錄物之頻率藉由相關序列標籤與序列群相遇之次數反映。

測試樣品中之基因表現亦可使用差異呈現(DD)方法分析。在DD中，由特定序列定界符(例如限制酶位點)限定之片段用作基因之唯一識別符，偶合有關於片段長度或片段在經表現基因內之位置的資訊。接著可依據所有可能片段之集合池內與彼基因相關之片段的相對表現度估計樣品內之經表現基因之相對表現度。進行DD之方法及組合物在此項技術中已熟知，參見例如美國專利第5,776,683號；及美國專利第5,807,680號。或者，使用依據核苷酸相互作用之特異性的雜交分析偵測樣品中之基因表現。寡核苷酸或cDNA可用於選擇性鑑別或捕捉具有特定序列組成之DNA或RNA，且定性或定量測定與已知捕捉序列雜交之RNA或cDNA之量以提供樣品中之細胞訊息集合池內特定訊息之相對表現度的資訊。可設計雜交分析以允許藉由使用例如具有高密度格式(包括過濾器、顯微鏡載片或微晶片)之陣列基技術或使用光譜分析(例如質譜)之溶液基技術並行篩檢數百至數千基因之相對表現。以下更詳細描述陣列在本發明診斷方法中之一種例示性用途。

可進行與陣列之雜交，其中該等陣列可根據此項技術中已知之任何適合方法產生。舉例而言，使用光引導合成技術產生寡核苷酸之大陣列之方法描述於美國專利第

5,134,854號及美國專利第5,445,934號中。使用電腦控制系統，經由在許多反應位點同時偶合可將單體之異質陣列轉化成聚合物之異質陣列。或者，藉由在固體基板上沈積預合成之寡核苷酸來產生微陣列，例如如PCT公開申請案第WO 95/35505號中所述。用於收集樣品與陣列雜交之資料之方法亦為此項技術中熟知的。舉例而言，細胞樣品之聚核苷酸可使用可偵測螢光標記產生，且藉由針對可偵測標記之存在掃描微陣列來偵測樣品中聚核苷酸之雜交。在裝置上偵測經螢光標記之目標之方法及裝置在此項技術中已知。一般而言，此等偵測裝置包括顯微鏡及將光導向基板的光源。光子計數器偵測來自基板之螢光，而x-y平移台(translation stage)改變基板位置。可用於標的方法中之共焦偵測裝置描述於美國專利第5,631,734號中。掃描雷射顯微鏡描述於Shalon等人，Genome Res. (1996) 6:639中。使用適當激發光線(excitation line)對所用各螢光團進行掃描。接著將掃描所產生之數位影像組合用於隨後分析。對於任何特定陣列元件，來自一樣品之螢光信號之比率與來自另一樣品之螢光信號相比較，且確定相對信號強度。用於分析自雜交陣列所收集之資料之方法在此項技術中已熟知。舉例而言，當雜交偵測包括螢光標記時，資料分析可包括以下步驟：根據所收集之資料確定隨基板位置而變之螢光強度；移除離群值，亦即偏離預定統計分佈之資料；及根據剩餘資料計算目標之相對結合親和力。所得資料可以影像呈現，其中各區域中之強度隨目標與探針之間的結

合親和力而變化。樣式匹配可手動進行，或可使用電腦程式進行。製備基板基質(例如陣列)、設計可供此等基質使用之寡核苷酸、探針標記、雜交條件、掃描雜交基質、及分析所產生樣式(包括比較分析)的方法描述於例如美國專利第5,800,992號中。分子及細胞生物化學中之一般方法亦可見於諸如以下之標準教科書中：A Laboratory Manual, 第3版(Sambrook等人，Harbor Laboratory Press 2001)；Short Protocols in Molecular Biology, 第4版(Ausubel等人編，John Wiley & Sons 1999)；Protein Methods(Bollag等人，John Wiley & Sons 1996)；Nonviral Vectors for Gene Therapy(Wagner等人編，Academic Press 1999)；Viral Vectors(Kaplift及Loewy編，Academic Press 1995)；Immunology Methods Manual(I. Lefkovits編，Academic Press 1997)；及Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology(Doyle及Griffiths, John Wiley & Sons 1998)。本發明中提及之用於遺傳操作之試劑、選殖載體及套組可購自商業供應商，諸如BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich及ClonTech。

實例

方法

析離程序。所有個體皆在投與細胞以調動幹細胞之前接受皮下注射G-CSF(Neupogen)480 µg為期至少2天或小於4天，或240 µg/kg單次劑量之AMD3100(普樂沙福，Mozobil®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA)且將在

投藥後當天經歷析離術。在經歷析離術之前，將抽取周邊血樣品(第1天、第2天、第3天、第4天及第5天)以監測白血球計數(WBC)且在第4天及第5天進行FACS分析以評估循環中CD34+細胞之調動功效以及測定析離參數。若個體WBC高於 $60,000/\text{mm}^3$ ，則中止G-CSF之傳遞且儘早執行析離術。析離術將在位於Beth Israel Medical Center, Petrie Division之New York Blood Center執行(參見醫學主任Dr. Vijay Shah之隨附證明信)。

MSC分離及擴增。所有個體之析離產物皆如下所述進行處理以根據標準技術分離用於細胞療法之MSC。

經調動之PB中之各種細胞群將使用菲科-帕克(Ficoll-Paque)、隨後藉由於50 ml錐形管中梯度離心加以分離。在已等分入50 ml管中之各10 ml菲科-帕克液體上形成20 ml PB層。此藉由緩慢及溫和地使PB沿管側向下流至流體上達成。分層管在室溫下在 $400\times g$ 下離心30分鐘。PB一經離心，即將中間白血球層置入T25培養燒瓶中。每個T25燒瓶將使用7 ml MSC完全培養基。每週兩次藉由光學顯微術檢查細胞之污染情況及細胞形態，且更換培養基。在更換培養基時洗滌未黏附細胞。在細胞匯合之後，其將傳代至T75燒瓶中。對於患者之細胞療法，將使用早期傳代(至多5次)。在向患者傳遞細胞之前，對最終細胞產品進行品質控制測試，包括表型表徵、核型分析、支原體(mycoplasma)及細菌測試。細胞劑量將為1,000,000個細胞。

製備自體培養之MSC。自T-75燒瓶移除培養基。用10 ml 1×無菌PBS洗滌各燒瓶2分鐘。移除PBS且添加1.2 ml胰蛋白酶(Trypsin)-EDTA至各燒瓶中。旋轉燒瓶以使胰蛋白酶完全包覆各燒瓶之底部。使燒瓶返回至培育箱中維持10分鐘。藉由檢查細胞圓整性及細胞移動性來檢查適當胰蛋白酶處理(trypsinization)。藉由添加5 ml MSC培養基至各燒瓶中使胰蛋白酶-EDTA不活化。使用吸液管來回緩和洗滌佈滿瓶底的培養基以使細胞捕捉最大化。使用同一吸液管將細胞/培養基混合物轉移至離心管中。將來自所有燒瓶之細胞及培養基合併入1個50 ml離心管中。在室溫下在400 g(1400 rpm)下離心細胞7分鐘。小心移除上清液且將細胞小球再懸浮於10 ml無菌生理鹽水(自藥房獲得之標準0.9%生理鹽水)中。在室溫下在400 g(1400 rpm)下離心細胞7分鐘。重複此程序2次。小心移除上清液且藉由將其懸浮於1.5 ml鹽水中並獲取此懸浮液稀釋10倍(10 µl於100 µl培養基中)之少量等分試樣來對細胞計數。血球計孔需要10 µl流體樣品。

向個體投藥以治療創口癒合：MSC接著與如下所述之血纖維蛋白凝膠混合且以4週間隔施用於創口3次。

製備及施用稀釋之血纖維蛋白凝膠/細胞混合物。以下說明利用1 ml TISSEEL VH套組(Baxter Healthcare, Inc.)製備稀釋之血纖維蛋白凝膠。此套組係利用兩個液相可經由雙室施用器擠壓或經由具有惰性氣體載劑之施用器噴灑。在此稀釋血纖維蛋白凝膠中，塗封蛋白(sealer

protein)及凝血因子(thrombin)之最終濃度分別為25單位/毫升。

藉由添加0.221 g CaCl_2 粉末至50 ml無菌生理鹽水中且在組織培養通風櫥下經0.22 μm 管頂過濾器過濾混合物來製備30 mM鈣(CaCl_2)於生理鹽水(0.9% NaCl)中之無菌混合物。為了配製凝血因子溶液，1 ml瓶裝凝血因子於加熱混合器中溶解20分鐘。一旦此混合物溶解，即用注射器自瓶抽出0.5 ml且與4.5 ml無菌 CaCl_2 混合物混合。此混合物於加熱混合器中保持溫熱。在初始溶解步驟之4小時內使用此稀釋凝血因子溶液。為了配製塗封蛋白，使用1 ml注射器添加1 ml無菌生理鹽水至塗封蛋白瓶中且於加熱混合器中溶解20分鐘。一旦此生理鹽水溶解，即用注射器自瓶抽取0.5 ml且與4.5 ml無菌生理鹽水混合。此混合物於加熱混合器中保持溫熱。在初始溶解步驟之4小時內使用此稀釋塗封蛋白。如下形成凝膠：首先視創口尺寸而定，決定凝膠之施用總量。兩種液體之每一者將為此總量之一半。在1 ml吸液管中，向上抽吸如塗封蛋白/細胞混合物之最終體積所必需之相同量的塗封蛋白。藉由於含有細胞之離心管中藉由緩和地向上及向下吸移(4次)來混合細胞與塗封蛋白。將塗封蛋白/細胞混合物向上抽入確保氣泡已移除之1 ml注射器中。將與塗封蛋白/細胞混合物之體積相同體積之凝血因子溶液向上抽入另一1 ml注射器中；再次敲出任何氣泡。移除針且將兩個注射器扣入紅色施用器中。接著將白色/透明施用器接頭置於注射器開口上。噴霧

時，將無菌氣體軟管與施用器接頭連接且在施用期間保持氣體供應流動以防止在施用器接頭中凝結。若將擠出而非噴出凝膠，則持續穩定緩慢擠壓直至所有流體用盡以避免在施用器接頭中凝結。

CFU-C測試(群落形成單位培養)

調整MEM(流動)中之股骨髓細胞數目至 2.5×10^6 個細胞/毫升。0.2 ml此懸浮液與0.5 ml馬血清、0.1 ml硫代甘油(20 mM，用MEM稀釋4倍)、1.0 ml甲基纖維素(2%於MEM中)、0.6 ml MEM(流動)及0.1 ml額外培養基或標準化經刺激小鼠血清(在腹膜內投與2.5 mg/kg脂多糖(LPS)之後3小時抽取之血清之200倍稀釋液)或5 ng/ml rhG-CSF混合。充分混合之半固體懸浮液吸入直徑為4 cm之皮氏培養皿(Petri dish)中且在37°C、5% CO₂及95%相對濕度下培育6天。在添加0.5 ml對碘硝基四唑鎢(p-iodonitrotetrazolium)紫色溶液(0.5 mg/ml PBS)之後，將培養皿再培育24小時。群落使用群落計數器計數且校準至 10^6 個骨髓細胞。

實例 1

自周邊血中分離MSC且擴增

本發明人係利用來源於經調動之周邊血之MSC，其中將粒細胞群落刺激因子(G-CSF)投與個體以自骨髓調動MSC至周邊循環中。藉由菲科分離及收集含有單核細胞之白血球層來使經調動之周邊血富含幹細胞。來自白血球層之細胞接著接種於含有MSC生長培養基之細胞培養燒瓶中。在前兩週之定期(每3天)培養基更換期間洗去未黏附細胞。黏

附細胞接著於MSC生長培養基中擴增至多5次傳代。

證明MSC由G-CSF調動至周邊血中

本發明人已證明，作為對2次連續皮下注射G-CSF(每天480 µg)的反應，MSC被調動至健康個體之周邊血中。在此實驗中，本發明人證明，在藉由多參數流動式細胞測量分析法所分析之調動前及經調動之周邊血樣品中，富含表現MSC表型(亦即CD45-、CD34-、CD105+、CD90+、CD29+)之大量細胞。圖6顯示在G-CSF調動之後，健康人類供者(n=5)之周邊血中之MSC數目顯著增加。單尾配對T檢驗已顯示，呈CD45-、CD34-、CD90+、CD105+、CD29+之MSC對G-CSF調動充分反應且相較於調動前樣品，調動後樣品中之MSC數目顯著增加(p=0.03)。

自經調動之周邊血獲得之MSC樣品的用途

慢性缺血性、糖尿病性及靜脈鬱滯創口影響數百萬美國人且導致大量病態(morbidity)，包括功能喪失、慢性疼痛症候群、及全身性感染、甚至致命性感染之風險增加。甚至當潛伏病狀已經改善時，皮膚創口痊癒之阻力亦可與以下相關：創口內之細胞(特定言之，「組織中」之幹細胞)衰老；基於疾病的對存在於成功創口癒合中之正常細胞-細胞及細胞-基質信號傳導之異常反應；或壞死性碎片及/或瘢痕，其對粗及顯微組織產生破壞，阻止體液或細胞對癒合過程之作用。特定言之，骨髓源性幹細胞之全身性細胞移行(trafficking)可在創口癒合中起重要作用且針對嫁接之此等內源性障壁可為重要的。使用已自具有慢性創口之患

者分離，經離體培養且施用於創口的人類自體骨髓源性(非周邊血源性)間質幹細胞(MSC)可對受影響肢體之所有組織層進行顯著功能性組織恢復且瘢痕形成最小。因此，本發明之一態樣係關於根據如本文揭示之方法自個體獲得之PB源性MSC的用途，MSC可自具有已自骨髓調動之更容易得到之循環MSC的個體(其中該等個體已經投與粒細胞群落刺激因子)獲得且自周邊血獲得。因此，該方法顯著優於直接自患者骨髓分離細胞之先前研究(一種可為費力、疼痛且昂貴之程序且在一些情況下不實用)。本發明人已證明自血液分離並捕捉MSC之程序使得獲得用於創口癒合之MSC之程序更簡單且實際上允許可在損傷之前收集並儲存幹細胞以供隨後使用。因此，本發明人證明直接對慢性未癒合皮膚創口施用經培養之自體循環MSC可達成顯著改善或完全創口癒合及功能復原及最小瘢痕形成。G-CSF誘導MSC自骨髓調動至周邊循環中，隨後執行行析離術以分離MSC。MSC在培養中生長，傳代至多5次，接著(以血纖維蛋白混合物形式)在3個時間點局部施用於創口，其中各時間點之間隔為4週。

儲藏MSC樣品供未來研究用。若MSC用於創口修復及癒合，則並非所有創口的癒合程度皆可能相同。判定各患者中可能傾向於或抑制創口癒合之潛伏病狀將為有用的。因此，可儲藏MSC用於未來分析。可能之預期輔助研究包括(但不限於)比較定量分析(藉由ELISA個別地或經由全面蛋白質組研究篩檢)調動前及調動後相關循環MSC群、血清

細胞激素及趨化因子；來自創口之鑽孔活檢體中細胞及擴散性因子之分化、活化、增殖及細胞凋亡標記隨時間的免疫組織化學及原位雜交分析。本發明人可在治療前及治療後使用MSC來預先對患者循環細胞群、血清及創口部位取樣且儲藏此等樣品以用於包括(但不限於)以下之進一步研究。

析離前及治療之每一天(但在治療之前)、及最終治療之後1個月之血清。此等樣品可用於相關個別循環趨化因子/細胞激素之ELISA評估，或有希望用於各患者及患者之間在不同時間點之完全蛋白質組研究分析及比較。

治療之每一天(但在治療之前)、最終治療之後1個月之創口之周邊及中心的鑽孔活檢體。各活檢體將對半分割，一片用於冷凍組織，一片用於福馬林固定及石蠟包埋。此等組織可用於根據標準方案對細胞群及局部擴散細胞激素及趨化因子及其在細胞膜上之受體、增殖及細胞凋亡標記進行免疫組織化學染色。

在用G-CSF調動之前及在析離時(亦即GSF後)對周邊血中循環幹細胞之不同亞群進行定量，該等亞群包括(但不限於)：CD34⁺、c-kit⁺、thy-1^{lo}、Sca-1⁺、lin⁻(「KTLS細胞」)、極小胚胎樣幹細胞(VSELS)及MSC。

實例2

使用如本文所述之方法獲得之MSC可用於治療或修復骨損壞及用於其他矯形適應症。尤其關注的是PB源性MSC及BM源性MSC治療以降低劇烈體格訓練期間應力骨折(stress

fracture)之發病率、或修復骨損傷(使用習知治療方法(例如骨刺激、激素及固定)而未癒合)的用途。在美國人口中每年有約800萬例骨折且近10%癒合受損。一般而言，在軍隊中，在基本訓練期間，男性中之應力骨折率多達5%；在女性中比率多達21%。在陸軍中，男性骨折數字為2.6%且女性骨折數字8.1%。處於骨折風險中之特定骨骼部位為尺骨(步槍訓練)；股頸(應力骨折)；上肢及下肢及下頷骨、顱面骨及鎖骨之暴發性損傷(blast injury)。此等骨折導致軍隊之所有分支每年1000萬美元醫藥成本及值勤時間損失。因此，使用如本文揭示之方法自個體獲得之自體MSC可促進不癒合骨折之癒合。

使用經皮置放、培養擴增之自體間質幹細胞進行骨折不癒合治療

長骨骨折不癒合為大幅增加平均骨折治療成本之嚴重健康問題。治療可採用若干形式，通常需要手術，包括骨移植及/或初始切開復位、內固定(ORIF)程序之檢核(revision)。更保守選項包括配合手術方法使用骨形態發生蛋白及骨刺激物。此等程序具有相對較高失敗率，表明明顯需要更新穎更有效方法來促進不癒合骨折之治療。

在此研究中，本發明人證明藉由如本文揭示之方法獲得之PB源性MSC及BM源性MSC可安全且有效用於修復骨損壞，且證明經由放射照相引導之注射投與PB源性MSC及BM源性MSC具有促進骨折不癒合中之骨再生的初步功效。此等PB源性MSC及BM源性MSC藉由增加骨再生來增

強癒合之組織環境以及恢復功能。

不希望受理論束縛，骨為經歷涉及新形成與再吸收之間平衡之連續重塑的特異化組織。當骨被破壞時，間質幹細胞(MSC)募集至損傷部位。MSC為可見於人類成人組織，包括骨髓(BM)、滑液組織、脂肪組織及周邊血(PB)中之多能細胞。因為其來源於中胚層，所以MSC能夠分化成骨、軟骨、肌肉及脂肪組織。正常骨折癒合不能在不存在內源可用MSC下進行，因為此等細胞會分化成為骨修復所需之多種細胞。儘管藥物尚未特別有效促進骨折癒合，但許多研究已表明對不癒合骨折部位直接施用MSC可使受損骨有效癒合。MSC譜系已在許多動物模型及人類中成功再生軟骨及骨。因此，藉由如本文揭示之方法獲得之自體PB源性MSC及BM源性MSC可以允許細胞分化成骨母細胞及為癒合所需之其他成熟細胞之方式向骨折部位投與。因此，如本文揭示之PB源性MSC及BM源性MSC適用作治療不癒合骨折之骨再生產品。

因此，根據如本文揭示之方法自經調動之血液獲得的PB源性MSC及BM源性MSC可用於治療各種病狀，包括骨折不癒合。

本發明人已證明自經調動之周邊血分離有活力之MSC的方法，且此等MSC可用於針對慢性創口及矯形適應症之自體MSC細胞療法的方法中。因為MSC具有自體性，所以排斥反應之風險有限或無風險。本發明人已證明投與G-CSF(480 µg，2天，皮下)顯示可將MSC自人類BM調動至PB。

或者，本發明人亦已證明MSC可藉由單次劑量之AMD3100 (240 $\mu\text{g/kg}$ ，皮下)調動至周邊血中。本發明人證明PB源性MSC及BM源性MSC可藉由如本文揭示之方法收集且視情況隨後擴增及/或超低溫保存。

自體BM-MSC及PB-MSC治療骨折不癒合之功效

為了評估MSC治療不癒合骨折之功效，本發明人執行12個月隨機安慰劑對照雙盲多中心1期臨床試驗，該試驗採用總計100名患者，分成4組，每組25名患者。一組用BM-MSC治療，第二組用PB-MSC治療且2個對照組用自體血小板溶解產物(PL，用於擴增MSC)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)治療。患者經招募且在4所矯形專業醫院加以治療。細胞在1個中心細胞培養機構經處理並擴增。藉由骨折部位之薄層CT量測可判定不癒合骨折癒合的主要終點。若骨折不癒合顯著小於($P<0.05$)對照治療組，則將評估MSC之功效。

方法：

*移植程序包括：*1.全骨髓抽吸：與骨髓收集程序一致，抽取200立方公分(cc)肝素化靜脈內靜脈血以用於產生自體PL。將骨髓吸出物抽入2個含有30,000 IU肝素之30 ml注射器中。分離有核細胞且於PBS中洗滌1次，計數，且接著再懸浮於DMEM+10% PL中且連同已收集之200 ml全靜脈內血液一起置放於4°C運輸包裝中且在24小時內運輸至細胞培養場所。

2. MSC之藥物誘導調動及收集：藉由在收集之前4小時

使用AMD3100(240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，皮下)來調動患者。執行析離術以收集約300 cc經調動之周邊血。抽取約200 cc肝素化靜脈內靜脈血以用於產生自體血小板溶解產物(PL)。析離產物連同已收集之200 ml全靜脈內血液一起置放於4°C運輸包裝中且經由24小時運輸傳遞至細胞培養場所。

3. 自體MSC擴增：細胞以 1×10^6 個細胞/ cm^2 接種於單層燒瓶中且在37°C /5% CO_2 下於含濕氣環境中培育。3天後更換培養基(含有自體PL)，移除未黏附細胞。MSC群將在接種之後6-12天形成。各培養物在達到40-50%匯合之後以1:3傳代。MSC生長至第1次-第3次傳代，接著懸浮於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)及符合其最大活體外培養擴增率之自體PL濃縮物中。

4. 治療產品處理。移植程序：最終MSC劑量為可以高達 1.0×10^7 個細胞之預期產量利用的最大劑量。MSC依次置放入無菌注射器、無菌傳遞袋及4°C冷卻器中以便運輸至操作室中。工作人員所需之說明書將連同產品一起包括在內。患者將返回至無菌操作室中且不癒合部位之區域將使用必達淨(betadine)及無菌手套進行預備處理。無菌套管針接著在c形臂(c-arm)上在若干位置處插入骨折部位中。用PBS稀釋2倍之威視派克(Visipaque)將用於確定骨折部位中放射照相對比劑之流動。將注射樣品注射入可確定染料流動之區域中。移除套管針。指示患者保持靜止30分鐘以允許細胞附著。

結果終點量測：使用操作前、1、3、6及12個月時骨折

部位之薄層CT掃描確定MSC改善骨折部位癒合的功效。檢視膠片(scout film)用於確定骨折部位面積。為了限制輻射曝露，視野確定為骨折部位近端2 cm及遠端2 cm。

實例3

本發明人已事先證明，人類臍帶血含有小(尺寸小於紅血球)CXCR4⁺CD133⁺CD34⁺SSEA-4⁺Oct-4⁺lin⁻CD45⁻細胞群(*Leukemia* 2007:21;297-303)且此等細胞在組織器官損壞期間調動至周邊血中，如在例如心肌梗塞(*J. Am. Coll. Cardiol.*, 2009:53;1-9.)及中風(*Stroke*. 2009:40;1237.)中所見。亦已報導鼠類器官中的類似細胞，且更重要的是，已描述此等細胞可活體外分化成所有3個胚層之細胞(*Leukemia* 2006:20;857-869)。為了研究人類VSEL可成為再生醫學中之多能幹細胞來源之可能性，本發明人開發出自成人患者分離此等細胞之高效策略。

本發明人已證明，VSEL與其鼠類對應物類似，可在注射粒細胞群落刺激因子(G-CSF)之後調動至周邊血中(*Stem Cells* 2008:26;2083-2092)。本發明人藉由招募一組使用G-CSF(每天480 µg，皮下)連續2天經調動之年輕健康供者來證明此現象。在第3天，藉由血液析離術收集有核細胞(TNC)。

本發明人評估G-CSF調動之前及之後周邊血(PB)樣品中之VSEL數目以及析離產物中之最終數目。獲得至少100萬個TNC且藉由FACS Diva軟體加以分析。分析富含VSEL(Lin⁻/CD45⁻/CD133⁺、Lin⁻/CD45⁻/CD34⁺、Lin⁻/CD45⁻/

CXCR4⁺)之非造血幹細胞、以及其CD45陽性造血對應物之3個不同部分。根據各個別樣品之各群體之百分比含量及TNC計數計算1 μ L樣品中所含之各群細胞的絕對數。

本發明人確定在G-CSF調動之後，人類周邊血含有表現CXCR4、CD34及CD133抗原之lin⁻CD45⁻單核細胞之群體。此等lin⁻CD45⁻CXCR4⁺CD133⁺CD34⁺細胞高度富含核內萬能胚胎轉錄因子(諸如Oct-4、Sox2及Nanog)之mRNA。更重要的是，本發明人發現，Oct-4表現於經調動之VSEL之核中且此等細胞亦表現細胞表面標記SSEA-4，其為通常用作未分化萬能人類胚胎幹細胞之標記的早期胚胎糖酯抗原。本發明人觀測到此等成人周邊血源性VSEL略微大於其在成年鼠類骨髓中鑑別之對應物，但仍然極小。此外，此等人類周邊血源性VSEL具有含有胚胎型無定形真染色質(euchromatin)之大核。

本發明人明確證明，在G-CSF調動之前，在周邊血中僅極少VSEL可偵測，而在G-CSF誘導之調動之後，析離產物中佔TNC小於0.01%之VSEL極顯著地增加，超過10⁶個。本發明人證明儘管VSEL為相對稀少之細胞，但其可調動至周邊血中且G-CSF誘導之調動適用於獲得人類萬能幹細胞以用於再生醫學。

參考文獻

本文及說明書整篇引用之所有參考文獻、專利及專利申請案皆以全文引用的方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖 1A-1D 顯示經調動之周邊血源性人類 MSC 活體外黏附及擴增。圖 1A 及 1B 展示培養於含有 10% FBS(胎牛血清)之 DMEM 中且以 1,000,000 個細胞/板(圖 1A)及 2,000,000 個細胞/板(圖 1B)接種的經調動之周邊血源性人類 MSC。圖 1C 及 1D 展示培養於 MesenCult-MS(C**商標?)中且以 1,000,000 個細胞/板(圖 1C)及 2,000,000 個細胞/板(圖 1D)接種之經調動之周邊血源性人類 MSC。

圖 2A-2D 顯示周邊血源性人類 MSC 為 CD45- 及 CD105+。圖 2A 顯示基於 CD45 之標記表現之析離產物的 FAC。圖 2B 顯示基於 CD45 之標記表現之黏附細胞的 FAC。黏附細胞富含不表現 CD45 之細胞。圖 2C 顯示基於 CD105 之標記表現之析離產物的 FAC。圖 2D 顯示基於 CD105 之標記表現之黏附細胞的 FAC。黏附細胞富含對 CD105 表現呈陽性之細胞。

圖 3A-3D 顯示周邊血源性人類 MSC 為 CD90+ 及 CD105+。圖 3A 顯示基於 CD90 之標記表現之漂浮細胞的 FAC。大多數漂浮細胞對 CD90 表現呈陰性。圖 3B 顯示基於 CD45 之標記表現之 1 次傳代(P1)後黏附細胞的 FAC。黏附細胞(1 次傳代)富含表現 CD90 之細胞。圖 3C 顯示基於 CD105 之標記表現之漂浮細胞的 FAC。大多數漂浮細胞對 CD105 表現呈陰性。圖 3D 顯示基於 CD105 之標記表現之 1 次傳代(P1)後黏附細胞的 FAC。黏附細胞(1 次傳代)富含表現 CD105 之細胞。

圖 4A-4B 顯示周邊血源性人類 MSC 為 CD44+。圖 4A 顯示

基於CD44之標記表現之漂浮細胞的FAC。大多數漂浮細胞對CD44表現呈陰性。圖4B顯示基於CD44之標記表現之1次傳代(P1)後黏附細胞的FAC。黏附細胞(1次傳代)富含表現CD44之細胞。

圖5為說明用於自經調動之周邊血中分離MSC群之步驟的示意圖。

圖6顯示G-CSF調動前及調動後周邊血中MSC之數目。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99142572

※申請日：99.12.6

※IPC 分類：~~A61K~~C12N^{5/6789 (2010.01)}

C12N^{5/677 (2010.01)}

一、發明名稱：(中文/英文)

從經調動之周邊血中分離之間質幹細胞

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) ISOLATED FROM
MOBILIZED PERIPHERAL BLOOD

二、中文發明摘要：

本發明大體上係關於一種自來自人類個體之周邊血樣品中獲得周邊血源性MSC(PB源性MSC)及骨髓源性MSC(BM源性MSC)之方法。特定言之，本發明係關於以下驚人發現：可在時間上調控MSC向周邊血中之調動且在諸如G-CSF或GM-CSF之調動劑投與人類個體後至少2天之後，人類周邊血中之循環MSC之數目達到峰值。因此，在一些實施例中，本發明係關於使用諸如G-CSF或GM-CSF之調動劑，自來自人類個體之周邊血，於活體內及離體下獲得PB源性及BM源性MSC的方法，其中G-CSF及/或GM-CSF之投與係經最佳化，以調動MSC且相對於諸如HSC之其他幹細胞群，富集周邊血中MSC之數目。

三、英文發明摘要：

The present invention generally relates to methods of obtaining peripheral blood-derived MSCs (PB-derived MSCs) and bone-marrow derived MSC (BM-derived MSCs) from a peripheral blood sample obtained from a human subject. In particular, the present invention relates to the surprising discovery that the mobilization of MSC into the peripheral blood is temporally regulated and that the number of circulating MSCs in human peripheral blood peaks after at least 2 days post administration of a mobilizing agent, such as G-CSF or GM-CSF to a human subject. Accordingly, in some embodiments, the present invention relates to methods of obtaining PB-derived and BM-derived MSC from peripheral blood from a human subject *in vivo* and *ex vivo* using mobilizing agents, such as G-CSF or GM-CSF, where administration of G-CSF and/or GM-CSF are optimized to mobilize MSCs and enrich the number of MSCs in the peripheral blood as apposed to other stem cell populations, such as HSCs.

七、申請專利範圍：

1. 一種自個體獲得周邊血源性人類間質幹細胞之方法，其包含：
 - a. 向該個體投與有效量之 G-CSF 或 GM-CSF 為期 4 天或小於 4 天；
 - b. 自得自該個體之周邊血樣品獲得人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於 CD34⁻、CD45⁻ 細胞表面標記呈陰性，且對於 CD44⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD29⁺ 及 CD73⁺ 細胞表面標記呈陽性；及
 - c. 相對於該周邊血中其他成體幹細胞，分離人類間質幹細胞。
2. 一種增加個體之周邊血中人類間質幹細胞群的方法，其包含：
 - a. 向個體之該周邊血投與有效量之 G-CSF 或 GM-CSF 為期 4 天或小於 4 天；
 - b. 自得自該個體之周邊血樣品獲得人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於 CD34⁻、CD45⁻ 細胞表面標記呈陰性，且對於 CD44⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD29⁺ 及 CD73⁺ 細胞表面標記呈陽性；及
 - c. 相對於該周邊血中其他成體幹細胞，分離人類間質幹細胞。
3. 一種自個體獲得人類間質幹細胞之方法，其包含：
 - a. 使得自該個體之周邊血樣品與有效量之 G-CSF 或 GM-CSF 接觸，以增加該周邊血樣品中人類間質幹細胞之

數目；

- b. 自該周邊血樣品獲得人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於CD34-、CD45-細胞表面標記呈陰性，且對於CD44+、CD90+、CD105+、CD29+及CD73+細胞表面標記呈陽性；及
 - c. 相對於該周邊血中其他成體幹細胞，分離人類間質幹細胞。
- 4. 如請求項1或2中任一項之方法，其中向該個體投與該有效量之G-CSF或GM-CSF為期3天或小於3天。
 - 5. 如請求項1或2中任一項之方法，其中向該個體投與該有效量之G-CSF或GM-CSF為期2天或小於2天。
 - 6. 如請求項1或2中任一項之方法，其中向該個體投與該有效量之G-CSF或GM-CSF為期1天。
 - 7. 如請求項1至6中任一項之方法，其中該個體為健康個體。
 - 8. 如請求項1至7中任一項之方法，其中該人類間質幹細胞群係使用基於尺寸之分離方法，自該周邊血樣品獲得。
 - 9. 如請求項1至8中任一項之方法，其中該人類間質幹細胞群係使用可排除非間質幹細胞之負向選擇法，自該周邊血樣品獲得，其中自包含間質幹細胞群及非間質幹細胞群之樣品分離並收集該人類間質幹細胞群。
 - 10. 如請求項1至9中任一項之方法，其中該人類間質幹細胞群係使用任何以下方法之組合，自該周邊血獲得：基於細胞表面標記之正向選擇法、基於細胞表面標記之負向

選擇法、基於尺寸之正向選擇法、基於尺寸之負向選擇法。

11. 一種自個體獲得人類間質幹細胞之方法，其包含：
 - a. 使周邊血樣品與有效量之 G-CSF 或 GM-CSF 活體外接觸，以增加該周邊血樣品中人類間質幹細胞之數目；
 - b. 自該周邊血樣品中分離人類間質幹細胞群，其中該等人類間質幹細胞對於 CD34-、CD45- 細胞表面標記呈陰性，且對於 CD44+、CD90+、CD105+、CD29+ 及 CD73+ 細胞表面標記呈陽性。
12. 如請求項 3 或 11 之方法，其中該周邊血樣品為經培養之周邊血樣品。
13. 如請求項 1、2、3 或 11 之方法，其中該周邊血樣品係經由血液析離術(apheresis)自該個體獲得。
14. 如請求項 13 之方法，其中析離產物之血球比容範圍為 2-3%。
15. 如請求項 3 或 11 之方法，其中該周邊血樣品為新鮮周邊血樣品。
16. 如上述請求項中任一項之方法，其中自該周邊血樣品獲得之該人類間質幹細胞群經培養擴增。
17. 如上述請求項中任一項之方法，其中自該周邊血樣品獲得之該人類間質幹細胞群經超低溫保存。
18. 如上述請求項中任一項之方法，其中該個體為人類個體。
19. 一種純系細胞株，其包含使用如上述請求項中任一項之

方法所分離的實質上純人類間質幹細胞群。

20. 一種容器，其包含合適培養基及如請求項18之人類間質幹細胞群的純系細胞株。
21. 如請求項19之容器，其中該合適培養基及人類間質幹細胞群之純系細胞株經超低溫保存。
22. 一種超低溫保存之人類間質幹細胞群，其係藉由如請求項1至17中之任何方法獲得。
23. 一種以人類間質幹細胞群或其分化子代用於治療有需要之個體之疾病或病症的用途，其中該人類間質幹細胞群係使用如上述請求項中任一項之方法分離，且其中向有需要之個體投與該人類間質幹細胞群或其分化子代，用於自體再生療法。
24. 一種用自體間質幹細胞(MSC)治療個體之疾病或病症的方法，其包含：
 - a. 利用周邊血樣品之MSC群，其中該周邊血樣品得自己接受投與調動劑4天或小於4天之個體，且其中該MSC群相對於該周邊血中之其他幹細胞為富集MSC群；及
 - b. 向該個體投與該MSC群，以治療該疾病或病症。
25. 如請求項23之方法，其中藉由正向選擇法富集MSC。
26. 如請求項23之方法，其中藉由淘洗法富集MSC。
27. 如請求項23之方法，其中該MSC群已經超低溫保存。
28. 如請求項23之方法，其中該富集MSC群包含非MSC細胞。
29. 如請求項23之方法，其中該富集MSC群包含至少10%

MSC。

30. 如請求項23之方法，其中該富集MSC群為實質上純MSC群。
31. 如請求項23或26之方法，其中該MSC群在投與該個體之前已於活體外擴增。
32. 如請求項23之方法，其中該個體為人類個體。
33. 一種自個體獲得周邊血源性人類幹細胞之方法，其包含：
 - a. 向該個體投與有效量之調動劑為期4天或小於4天；
 - b. 自得自該個體之周邊血樣品獲得人類幹細胞群；及
 - c. 相對於該周邊血中其他成體幹細胞，分離人類幹細胞。
34. 如請求項33之方法，其中該等幹細胞為間質幹細胞。
35. 如請求項33之方法，其中該等幹細胞為「極小胚胎樣幹細胞(VSEL)」。
36. 如請求項33之方法，其中該調動劑為G-CSF或GM-CSF。
37. 如請求項33之方法，其中該調動劑係選自由介白素-17、AMD3100、環磷醯胺(cyclophosphamide；Cy)、歐洲紫杉醇(Docetaxel)及(DXT)組成之群。

八、圖式：

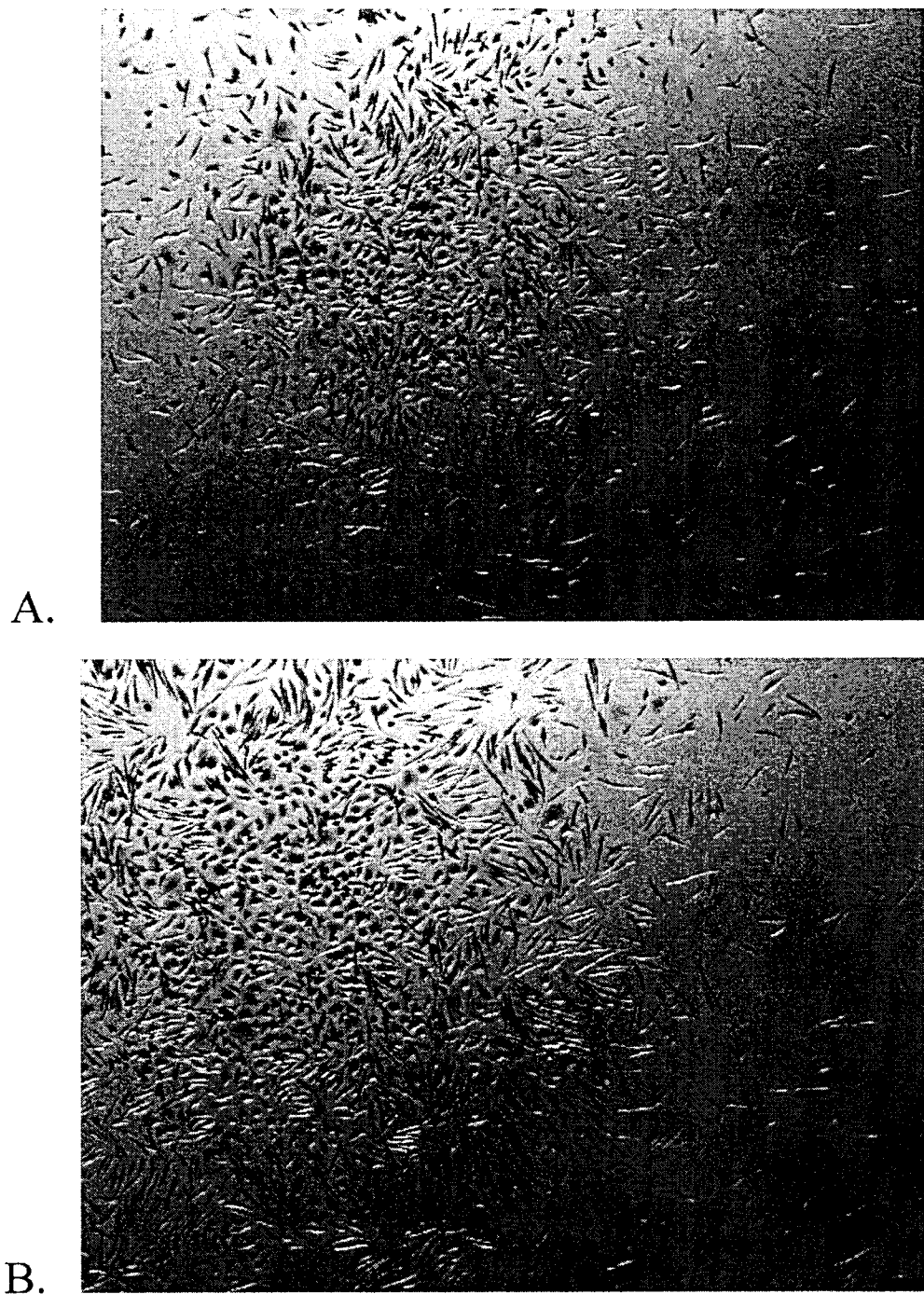


圖1



圖1 (接續)

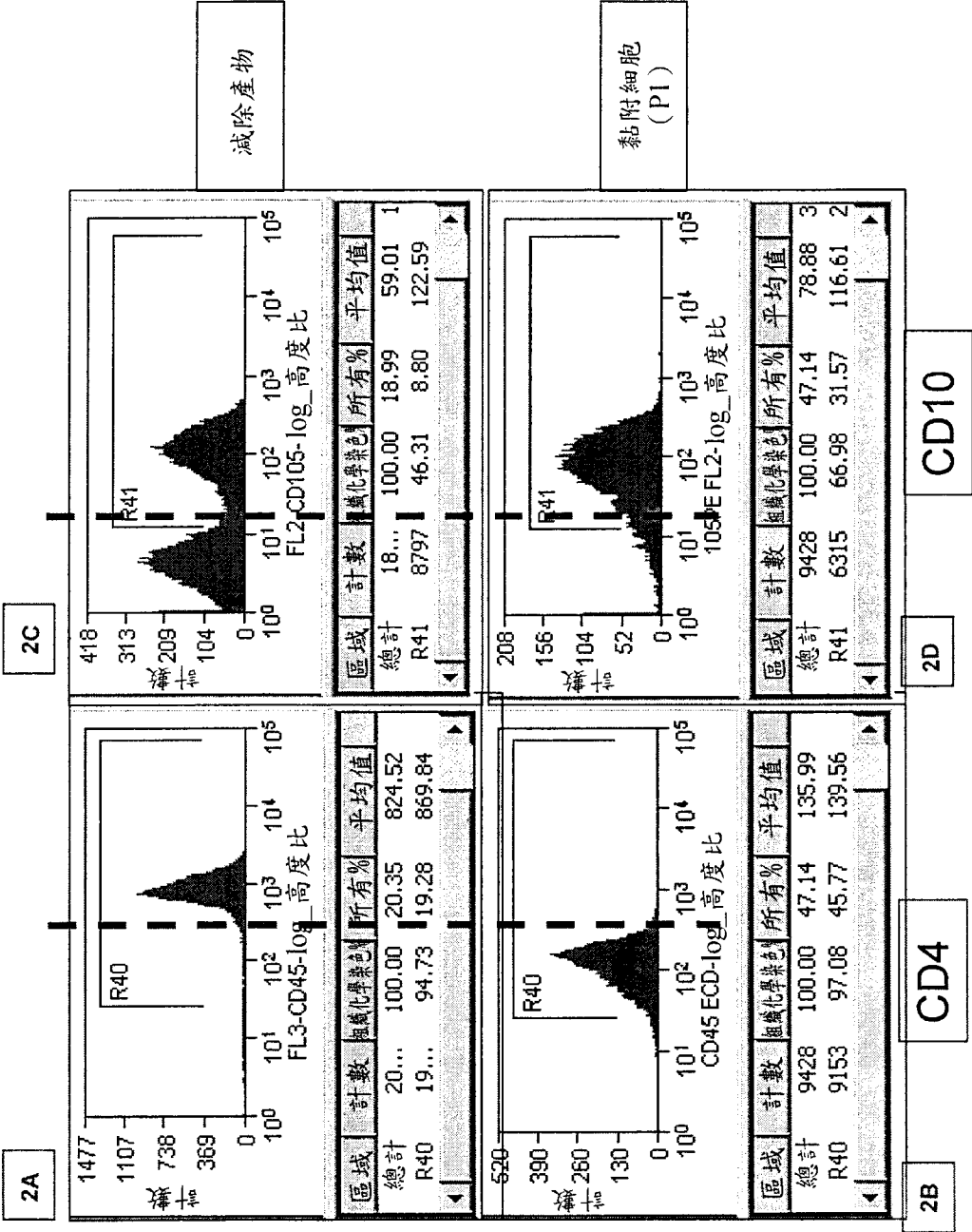


圖2

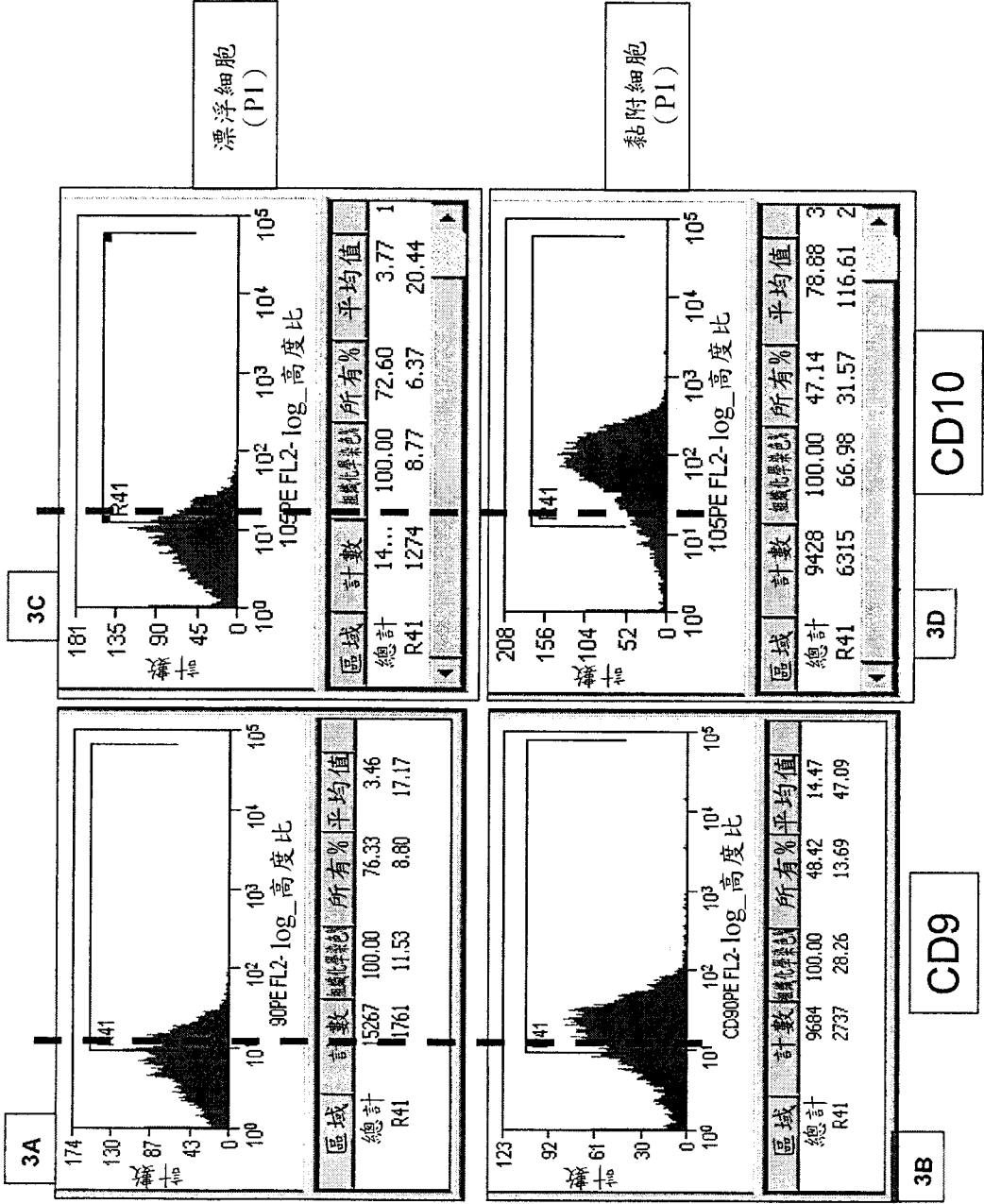


圖3

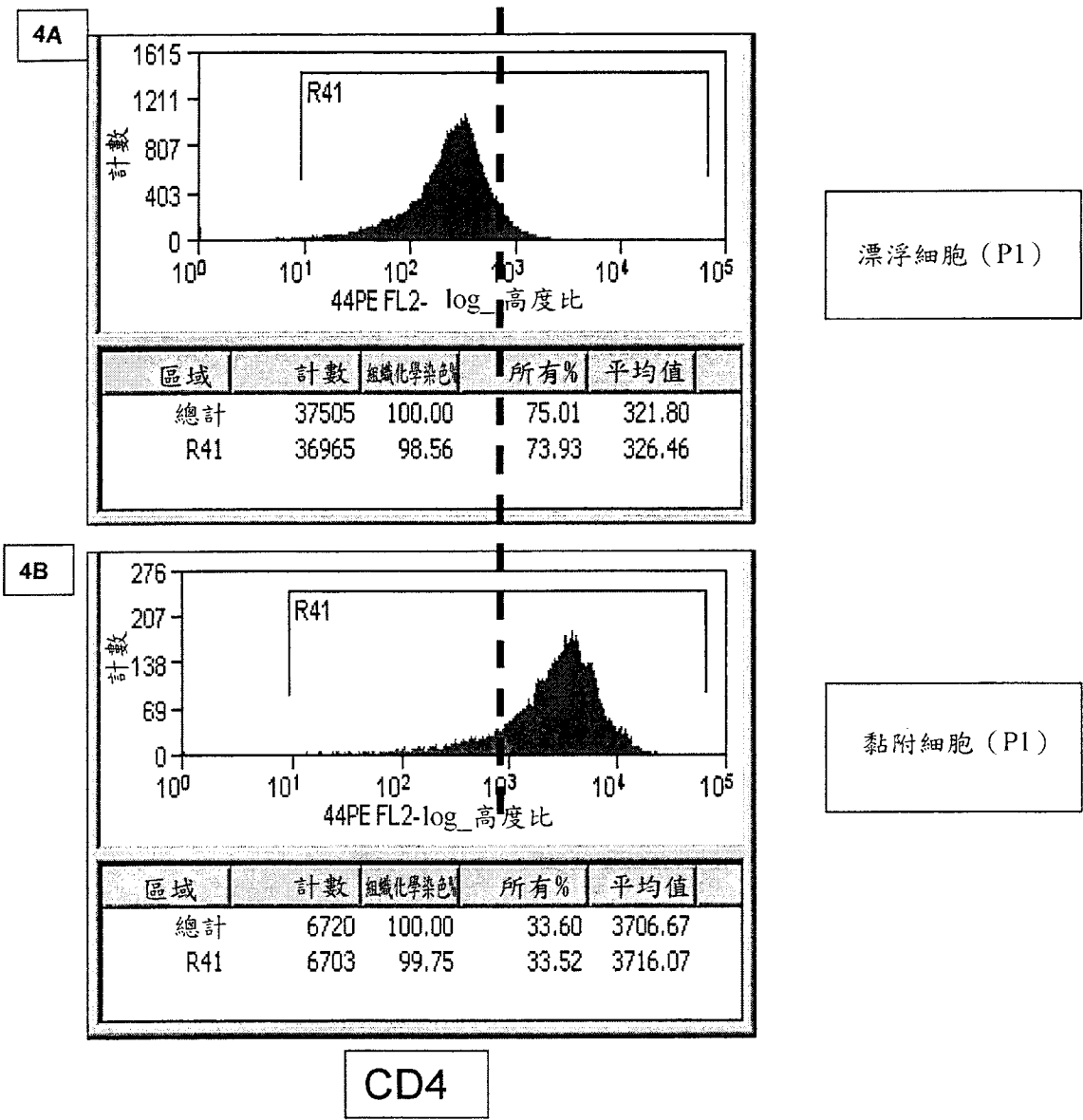


圖 4

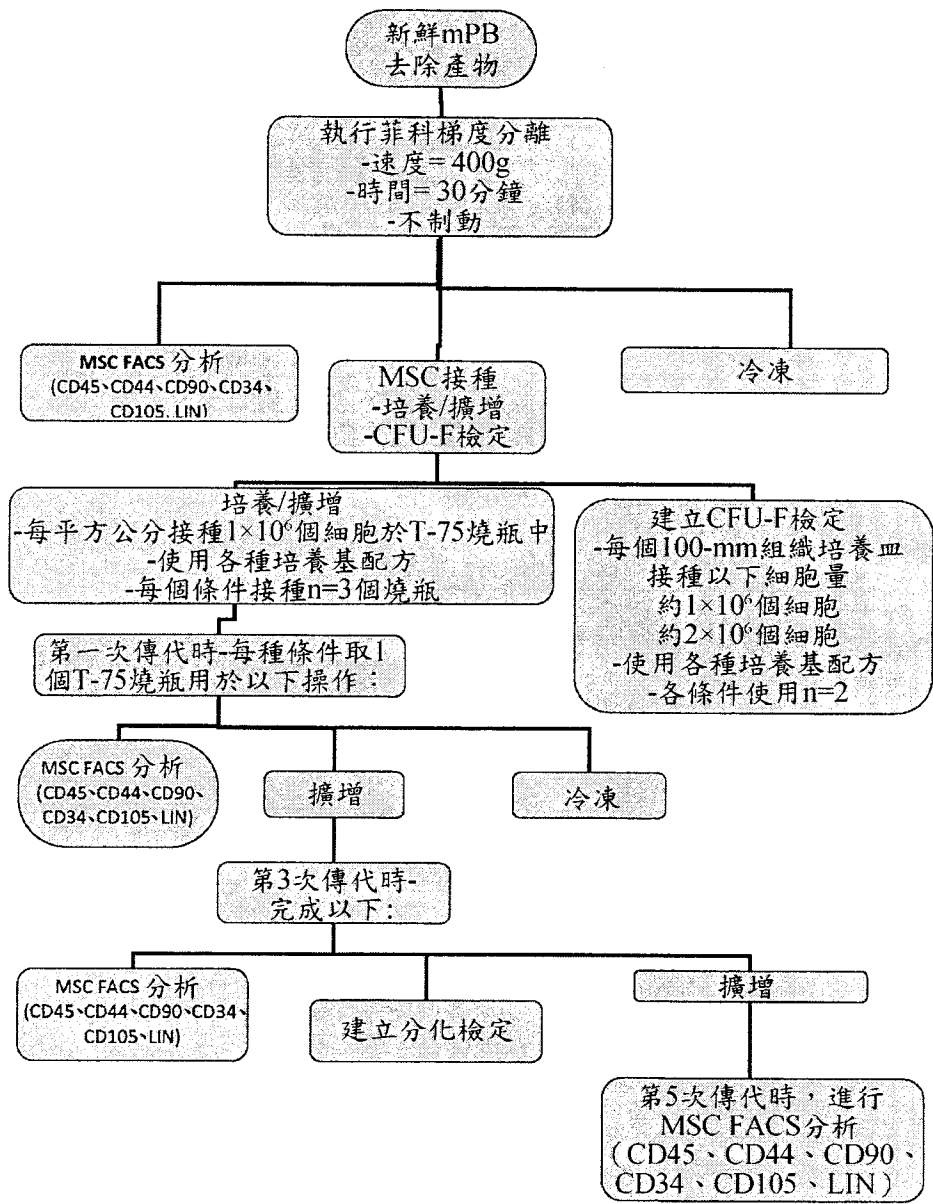


圖5

GCSF調動前及調動後周邊血中MSC之數目

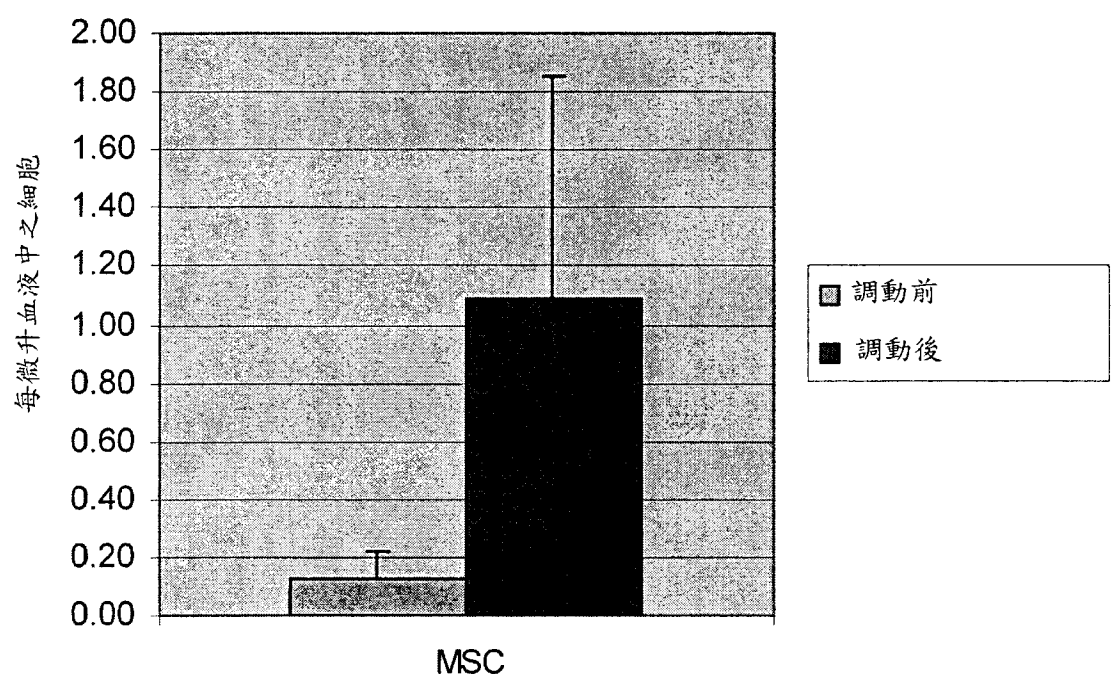


圖6

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)