



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I698527 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 11 日

(21)申請案號：101145218

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 11 月 30 日

(51)Int. Cl. : C12N5/077 (2010.01)

A61K35/12 (2015.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/11/30 美國

61/565,358

(71)申請人：安斯泰來再生醫藥協會 (美國) ASTELLAS INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE (US)

美國

(72)發明人：金布萊爾 艾琳 安 KIMBREL, ERIN ANNE (US)；蘭薩 羅伯特 LANZA, ROBERT (US)；鄒建林 CHU, JIANLIN (US)；高瑞斯 尼可拉斯 亞瑟 KOURIS, NICHOLAS ARTHUR (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2008/0095749A1

Tan Z et al., "Immunomodulative effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in vivo and in vitro",

Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 12(1):18-27, 2011/01/06

Conget PA et al., "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells", Journal of Cellular

Physiology, 181(1):67-73, 1999/08/20

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：32 共 145 頁

(54)名稱

利用血管母細胞產生間葉基質細胞之方法

(57)摘要

本發明概言之係關於源自血管母細胞之間葉基質細胞(MSC)之新穎製劑、獲得此等 MSC 之方法，及利用此等 MSC 治療病狀之方法。本發明方法產生大量具有保持效能之幼年表型之 MSCs，其可用於治療病狀。

The present invention generally relates to novel preparations of mesenchymal stromal cells (MSCs) derived from hemangioblasts, methods for obtaining such MSCs, and method sof treating a pathology using such MSCs. The methods of the present invention produce substantial numbers of MSCs having a potency-retaining youthful phenotype, which are useful in the treatment of pathologies.

指定代表圖：

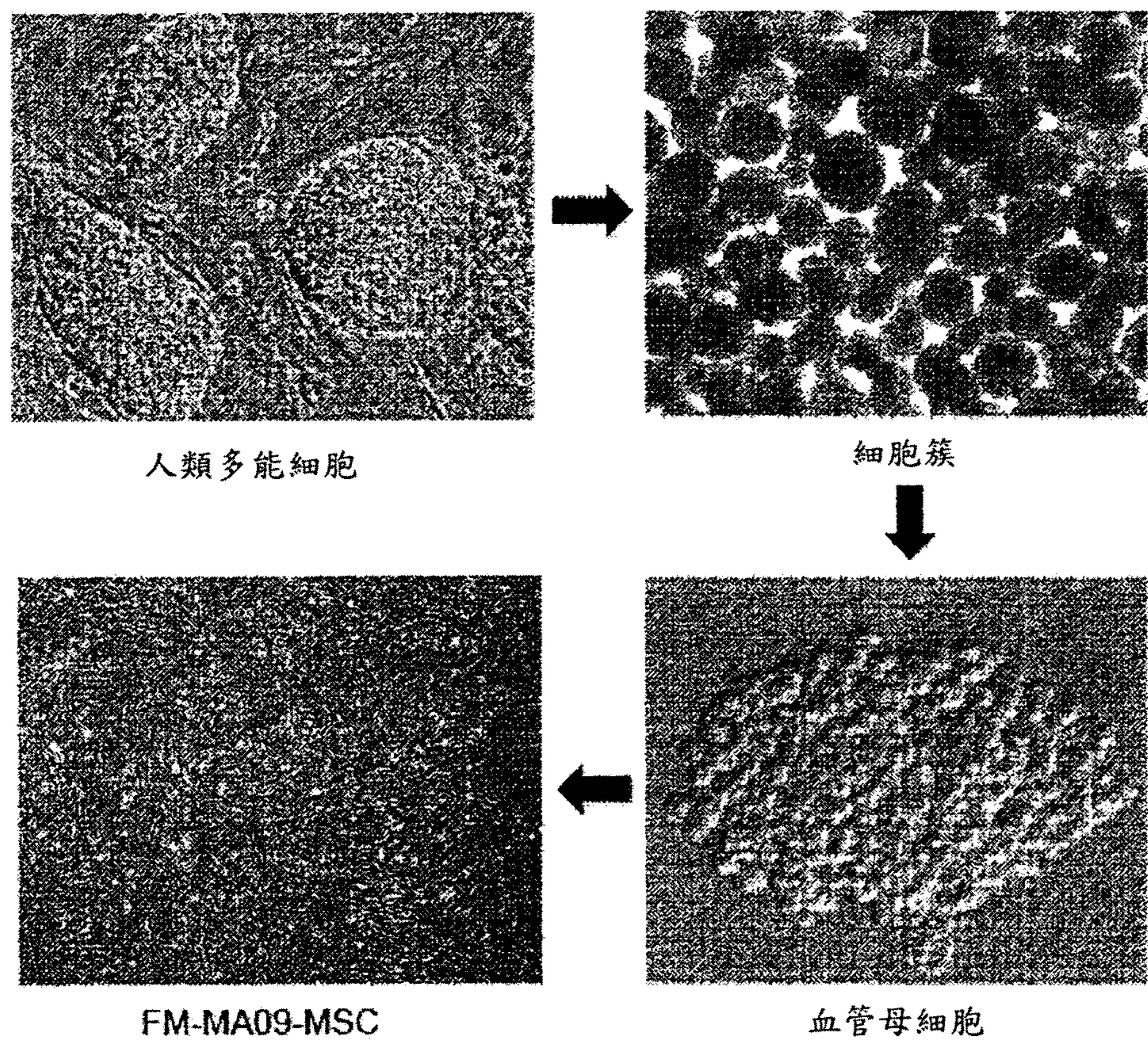


圖 1

I698527

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：101145218

C12N 5/077 (2010.01)

※申請日：101年11月30日

※IPC 分類：A61K 35/12 (2015.01)

A61P 37/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

利用血管母細胞產生間葉基質細胞之方法

METHODS OF GENERATING MESENCHYMAL STROMAL CELLS
USING HEMANGIOBLASTS

二、中文發明摘要：

本發明概言之係關於源自血管母細胞之間葉基質細胞(MSC)之新穎製劑、獲得此等MSC之方法，及利用此等MSC治療病狀之方法。本發明方法產生大量具有保持效能之幼年表型之MSCs，其可用於治療病狀。

三、英文發明摘要：

The present invention generally relates to novel preparations of mesenchymal stromal cells (MSCs) derived from hemangioblasts, methods for obtaining such MSCs, and method of treating a pathology using such MSCs. The methods of the present invention produce substantial numbers of MSCs having a potency-retaining youthful phenotype, which are useful in the treatment of pathologies.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)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)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於利用基於細胞之療法來減少個體之病理表現且亦影響病理起源，以使界定病理之異常返回正常情形。特定而言，本發明係關於具有新穎幼年型表型之間葉基質細胞(MSC)，該表型賦予減少個體之病理表現之高效能。

[相關申請案之交互參照]

本申請案主張對2011年11月30日提出申請之美國臨時申請案第61/565,358號之優先權益，該案件之內容以整體引用方式併入本文中。

【先前技術】

許多病狀在臨床上經由宿主內之不期望或過度免疫反應來表現，例如，移植排斥及自體免疫病症。已研發免疫抑制療法來治療該等症狀，但不治療特徵在於過度免疫反應之病狀之根本病因。該等療法可有效下調免疫功能，且因此可能帶來嚴重不良事件，包括癌症及伺機性感染；以及來自諸如潑尼松(prednisone)、環孢菌素(cyclosporine)及他克莫司(tacrolimus)等藥劑之副效應，例如白內障、高血糖症、瘀傷及腎毒性。

儘管已研發不抑制整個免疫系統之療法，但仍存在與該等方案相關之限制。該等免疫調節治療靶向免疫系統內之較窄干預點且因此具有不同的有時不太嚴重之副效應。此等免疫調節療法之實例包括利用抗體(例如，抗-CD3或抗-IL2R)。儘管可順利誘導無反應性狀態升高，但停止該等

免疫調節療法會導致回復至不期望之病狀。

多發性硬化(MS)係由中樞神經系統(CNS)中神經元軸突周圍之髓鞘發炎引起的自體免疫病症。MS患者經受多種神經症狀，包括麻痺。僅在美國就有約400,000名MS患者，而且當前對於此疾病尚無治癒或有效療法。已發現，骨髓源MSC(BM-MSC)[1至5]或脂肪源MSC[6]可預防或延遲實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)發作，該EAE係模擬在MS及CNS之其他脫髓鞘疾病中發現之病理生理狀況之公認動物模型。然而，受限來源及不同品質之骨髓或脂肪供體限制來自該等來源之MSC之研究及應用。因此，科學工作者已試圖利用人類胚胎幹細胞(ESC)作為MSC之另一來源(即，產生源自ESC之MSC或ESC-MSC)。

源自ESC之MSC可以長期供應及高度可控方式產生，由此減輕利用供體依賴性來源之問題。由於無需長期植入MSC，因此基本上不用擔心主要組織相容性(MHC)之錯配[7、8]。已經由各種方法(包括與鼠類OP9細胞共培養或手選程序)獲取源自ESC之MSC[9至13]。然而，該等方法係冗長的，且MSC之產生率較低，品質變化且缺乏效能。因此，業內仍需要經改良MSC及其製備方法。

【發明內容】

本發明係關於間葉基質細胞(MSC)及產生MSC之方法。本發明方法產生特徵在於賦予高效能之幼年型表型之大量源自血管母細胞的高品質間葉基質細胞。源自血管母細胞之MSC製劑可用於治療病狀，包括不期望之免疫反應，例

如，自體免疫病症。

本發明包含利用培養血管母細胞之經改良方法自血管母細胞產生的經改良MSC製劑。本發明間葉基質細胞製劑與直接源自胚胎幹細胞(ESC)之間葉基質細胞相比保持更高程度之效能且不凝塊或顯著更少凝塊。根據本發明任一或多種方法產生之間葉基質細胞製劑與直接源自ESC之間葉基質細胞相比保持更高程度之效能，且不凝塊或凝塊顯著更少。

在一個態樣中，本發明提供醫藥製劑包含間葉基質細胞，其中該等間葉基質細胞能夠經受至少10次群體倍增，例如，在約22天至27天內發生至少10次群體倍增。醫藥製劑可藉由血管母細胞之活體外分化產生。間葉基質細胞可為靈長類動物細胞，例如，人類細胞。間葉基質細胞可能能夠經受至少15次群體倍增。例如，間葉基質細胞經受至少20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次或更多次群體倍增。製劑可包含小於約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%多能細胞。較佳地，製劑不含多能細胞。製劑可包含至少90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%間葉基質細胞。

在一個態樣中，該等間葉基質細胞中之至少50%對以下為陽性：(i) CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73及CD90中之至少一者；(ii) CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD44、CD166、CD274及HLA-ABC中之至少一者；或(iii)其任一組合。在一個態樣中，該等間葉基質細胞中之至少50%對以下為陽性：(i) CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73及CD90中之至少兩者；(ii)該等間葉基質細胞中之至少50%對以下為陽性：全部CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD44、CD166、CD274及HLA-ABC。在再一態樣中，該等間葉基質細胞中之至少50%(i)對以下為陽性：全部CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD44、CD166、CD274及HLA-ABC，且(ii)不表現或表現較低量之以下中之至少一者：CD31、34、45、133、FGFR2、CD271、Stro-1、CXCR4、TLR3及TLR4。另外，此等間葉基質細胞中之至少60%、70%、80%或90%可對以下為陽性：(i) CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73及CD90中之一或多者；或(ii) CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73、CD90、CD105、CD13、

CD29、CD44、CD166、CD274及HLA-ABC中之一或多者。

在一個態樣中，醫藥製劑包含可有效治療或預防有需要之個體之不期望免疫反應之量的間葉基質細胞。醫藥製劑可進一步包含用於移植至有需要之接受者中之其他細胞、組織或器官。其他實例性細胞或組織包括RPE細胞、皮膚細胞、角膜細胞、胰腺細胞、肝細胞或心細胞或含有該等細胞中之任一者之組織。

在另一態樣中，間葉基質細胞並非源自骨髓，且該製劑在免疫調節分析中之效能大於骨髓源間葉基質細胞製劑之效能。效能可藉由測定EC50劑量之免疫調節分析來分析。

在一個態樣中，製劑在10次群體倍增後保持其增殖能力之介於約50%與100%之間。

在另一態樣中，醫藥製劑之間葉基質細胞並非直接源自多能細胞，且其中該等間葉基質細胞(a)不凝塊或凝塊顯著少於直接源自ESC之間葉基質細胞；(b)與直接源自ESC之間葉基質細胞相比在分裂時更容易分散；(c)當以等數目之ESC開始時數目比直接源自ESC之間葉基質細胞大；及/或(d)比直接源自ESC之間葉基質細胞更快獲得特徵性間葉細胞表面標記物。

本發明進一步涵蓋產生間葉基質細胞之方法，其包含在產生間葉幹細胞之條件下培養血管母細胞或血管群落形成細胞。可在無飼養層條件下培養血管母細胞或血管群落形成細胞。另外，可將血管母細胞平鋪於包含(例如)以下因

子之基質上：轉化生長因子 β (TGF- β)、表皮生長因子(EGF)、類胰島素生長因子1、牛纖維母細胞生長因子(bFGF)及/或血小板源生長因子(PDGF)。基質可選自由以下組成之群：層黏連蛋白、纖連蛋白、玻連蛋白、蛋白聚糖、內動蛋白、膠原、膠原I、膠原IV、硫酸乙醯肝素、基質膠(Matrigel，來自Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)小鼠肉瘤細胞之可溶性製劑)、人類基底膜提取物及其任一組合。基質可包含來自Engelbreth-Holm-Swarm小鼠肉瘤細胞之可溶性製劑。

在一個態樣中，間葉基質細胞係哺乳動物細胞。較佳地，間葉基質細胞係人類、犬類或馬類。

在一個態樣中，在包含 α MEM之培養基中培養血管母細胞或血管群落形成細胞。在另一態樣中，在包含血清或血清替代物之培養基中培養血管母細胞或血管群落形成細胞。例如，可在包含 α MEM之培養基中培養血管母細胞或血管群落形成細胞，該 α MEM補充有0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%胎牛血清。血管母細胞或血管群落形成細胞可在該基質上培養至少約14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天。

在一個態樣中，血管母細胞或血管群落形成細胞係自多能細胞(例如iPS細胞)或分裂球分化。多能細胞可源自一或

多個分裂球而不破壞人類胚胎。另外，可藉由包含以下之方法自多能細胞分化yhr血管母細胞或血管群落形成細胞：(a)培養該等多能細胞以形成細胞簇。在一個態樣中，在血管內皮生長因子(VEGF)及/或成骨蛋白4(BMP-4)存在下培養多能細胞。可在起始多能細胞培養0至48小時內將VEGF及BMP-4添加至該細胞培養物，且視情況以20 nm/mL至100 nm/mL之濃度添加該VEGF，且視情況以15 nm/mL至100 ng/mL之濃度添加該BMP-4。

在一個態樣中，藉由進一步包含以下之方法自多能細胞分化血管母細胞或血管群落形成細胞：(b)在至少一種生長因子存在下培養該等單細胞，該至少一種生長因子之量足以誘導該等細胞簇分化成血管母細胞。步驟(b)中添加之至少一種生長因子可包含以下中之一或多者：鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、血管內皮生長因子(VEGF)、成骨蛋白4(BMP-4)、幹細胞因子(SCF)、Flt 3L(FL)、血小板生成素(TPO)、EPO及/或tPTD-HOXB4。可在步驟(a)開始後36小時至60小時內將在步驟(b)中添加之該至少一種生長因子中之一或多者添加至該培養物。較佳地，在步驟(a)開始後48小時至72小時內將在步驟(b)中添加之該至少一種生長因子中之一或多者添加至該培養物。在步驟(b)中添加之至少一種因子可包含bFGF、VEGF、BMP-4、SCF及/或FL中之一或多者。該等生長因子(若在步驟(b)中添加)之濃度可大約在以下範圍內：bFGF係約20 ng/ml至25 ng/ml，VEGF係約20 ng/ml至100 ng/ml，BMP-4係約15 ng/ml至100 ng/ml，

SCF 係約 20 ng/ml 至 50 ng/ml，FL 係約 10 ng/ml 至 50 ng/ml，TPO 係約 20 ng/ml 至 50 ng/ml，且 tPTD-HOXB4 係約 1.5 U/ml 至 5 U/ml。

在另一態樣中，該方法進一步包含(c)視情況將該等細胞簇解離成單細胞。在另一態樣中，該方法進一步包含(d)在包含至少一種其他生長因子之培養基中培養該等血管母細胞或血管群落形成細胞，其中該至少一種其他生長因子之量足以擴增血管母細胞或血管群落形成細胞。(d)之至少一種其他生長因子可包含以下中之一或多者：胰島素、轉鐵蛋白、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、介白素-3(IL-3)、介白素-6(IL-6)、顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、紅血球生成素(EPO)、幹細胞因子(SCF)、血管內皮生長因子(VEGF)、成骨蛋白 4(BMP-4)及/或 tPTD-HOXB4。步驟(d)中之實例性濃度包括約 10 µg/ml 至 100 µg/ml 胰島素、約 200 µg/ml 至 2,000 µg/ml 轉鐵蛋白、約 10 ng/ml 至 50 ng/ml GM-CSF、約 10 ng/ml 至 20 ng/ml IL-3、約 10 ng/ml 至 1000 ng/ml IL-6、約 10 ng/ml 至 50 ng/ml G-CSF、約 3 ng/ml 至 50 U/ml EPO、約 20 ng/ml 至 200 ng/ml SCF、約 20 ng/ml 至 200 ng/ml VEGF、約 15 ng/ml 至 150 ng/ml BMP-4 及/或約 1.5 U/ml 至 15 U/ml tPTD-HOXB4。步驟(a)、(b)、(c)及/或(d)中之培養基可為無血清培養基。

在一個態樣中，該方法產生至少 80,000,000 個、85,000,000 個、90,000,000 個、95,000,000 個、100,000,000 個、125,000,000 個或 150,000,000 個間葉基質細胞。可在開

始誘導該等ESC分化至少10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天或18天後收穫血管母細胞或血管群落形成細胞。可在開始誘導該等多能細胞分化至少25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天、35天、36天、37天、38天、39天、40天、41天、42天、43天、44天、45天、46天、47天、48天、49天或50天後產生間葉基質細胞。在另一態樣中，該方法可在培養約15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天或35天內自約200,000個血管母細胞及/或血管群落形成細胞產生至少80,000,000個、85,000,000個、90,000,000個、95,000,000個、100,000,000個、125,000,000個或150,000,000個間葉基質細胞。可在培養約26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天或35天內自血管母細胞及/或血管群落形成細胞產生間葉基質細胞，血管母細胞對間葉基質細胞之比率為至少1:200、1:250、1:300、1:350、1:400、1:415、1:425、1:440、1:450、1:365、1:475、1:490及1:500。細胞可為人類細胞。

本發明亦涵蓋藉由所述方法獲得之源自血管母細胞及/或血管群落形成細胞之間葉基質細胞。在一個態樣中，本發明包括源自血管母細胞及/或血管群落形成細胞之活體外分化之間葉基質細胞。該等間葉基質細胞中之至少50%可(i)對以下為陽性：CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、

ANG-1、CXCL1、CD105、CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD44、CD166、CD274及HLA-ABC，且(ii)不表現或表現較低量之以下中之至少一者：CD31、34、45、133、FGFR2、CD271、Stro-1、CXCR4、TLR3及TLR4。或者，該等間葉基質細胞中之至少50%可對以下為陽性：(i)全部CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73及CD90；或(ii)全部CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD44、CD166、CD274及HLA-ABC。該等間葉基質細胞中之至少60%、70%、80%或90%可對以下為陽性：(i)CD10、CD24、IL-11、AIRE-1、ANG-1、CXCL1、CD105、CD73及CD90中之至少一者；或(ii)CD73、CD90、CD105、CD13、CD29、CD44、CD166、CD274及HLA-ABC中之至少一者。較佳地，間葉基質不表現或表現較低量之以下中之至少一者：CD31、34、45、133、FGFR2、CD271、Stro-1、CXCR4、TLR3及TLR4。

在另一態樣中，本發明涵蓋本文所述間葉基質細胞製劑。製劑可包含小於10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、

0.0002%或0.0001%多能細胞。較佳地，製劑不含多能細胞。製劑可實質上經純化且視情況包含至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%人類間葉基質細胞。製劑可包含實質上類似之含量之p53及p21蛋白，或其中p53蛋白之含量係p21蛋白之1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。另外，製劑可包含背景含量之活性含氧物。間葉基質細胞可能能夠在培養中經受至少5次群體倍增。較佳地，間葉基質細胞能夠在培養中經受至少10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次或更多次群體倍增。

在一個態樣中，間葉基質細胞(a)不凝塊或凝塊顯著少於直接源自ESC之間葉基質細胞；(b)與直接源自ESC之間葉基質細胞相比在分裂時更容易分散；(c)當以等數目之ESC開始時數目比直接源自ESC之間葉基質細胞大；及/或(d)比直接源自ESC之間葉基質細胞更快獲得特徵性間葉細胞表面標記物。本發明涵蓋包含此等間葉基質細胞之醫藥製劑，其包含一定量之可有效治療不期望免疫反應之間葉基質細胞。製劑可包含一定量之可有效治療不期望之免疫反應之間葉基質細胞且進一步包含移植至有需要之接受者中之其他細胞或組織。其他實例性細胞包括同種異體或同源胰腺細胞、神經細胞、肝細胞、RPE細胞或角膜細胞或含有任一上述細胞之組織。醫藥製劑可用於治療自體免疫病症或抵抗同種異體細胞之免疫反應，包括(但不限於)多發

性硬化、全身性硬化、血液惡性腫瘤、心肌梗塞、器官移植排斥、慢性同種異體移植腎病、硬化、肝衰竭、心臟衰竭、GvHD、脛骨骨折、左心室功能障礙、白血病、骨髓發育不良症候群、克隆氏病(Crohn's disease)、糖尿病、慢性阻塞性肺病、骨發生不全、純合性家族性低膽固醇血症、半月板切除後治療、成人牙周炎、嚴重心肌缺血患者之血管發生、脊髓損傷、骨發育不良、危急性(critical)肢體缺血、糖尿病性足病、原發性薛格連氏症候群(primary Sjogren's syndrome)、骨關節炎、軟骨缺損、蹄葉炎、多系統萎縮、肌萎縮性脊髓側索硬化、心臟手術、全身性紅斑性狼瘡、活腎同種異體移植、非惡性紅血球病症、熱灼傷、輻射灼傷、帕金森氏病(Parkinson's disease)、微骨折、大皰性表皮鬆懈、嚴重冠狀動脈缺血、特發性擴張性心肌病變、股骨頭骨壞死、狼瘡腎炎、骨間隙缺損、缺血性腦中風、中風後、急性輻射症候群、肺病、關節炎、骨再生、葡萄膜炎或其組合。

本發明進一步涵蓋包含本文所述間葉基質細胞或間葉基質細胞製劑之套組。套組可包含冷凍或極冷保藏之間葉基質細胞或間葉基質細胞製劑。包含於套組中之間葉基質細胞或間葉基質細胞製劑可含於細胞遞送媒劑中。

此外，本發明涵蓋治療疾病或病症之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之本文所述間葉基質細胞或間葉基質細胞製劑。該方法可進一步包含移植其他細胞或組織，例如，視網膜細胞、RPE細胞、角膜細胞、神經細胞、免

疫細胞、骨髓細胞、肝細胞或胰腺細胞。所治療實例性疾病或病症包括(但不限於)多發性硬化、全身性硬化、血液惡性腫瘤、心肌梗塞、器官移植排斥、慢性同種異體移植腎病、硬化、肝衰竭、心臟衰竭、GvHD、脛骨骨折、左心室功能障礙、白血病、骨髓發育不良症候群、克隆氏病、糖尿病、慢性阻塞性肺病、骨發生不全、純合性家族性低膽固醇血症、半月板切除後治療、成人牙周炎、嚴重心肌缺血患者之血管發生、脊髓損傷、骨發育不良、危急性肢體缺血、糖尿病性足病、原發性薛格連氏症候群、骨關節炎、軟骨缺損、多系統萎縮、肌萎縮性脊髓側索硬化、心臟手術、頑固性全身性紅斑性狼瘡、活腎同種異體移植、非惡性紅血球病症、熱灼傷、帕金森氏病、微骨折、大皰性表皮鬆懈、嚴重冠狀動脈缺血、特發性擴張性心肌病變、股骨頭骨壞死、狼瘡腎炎、骨間隙缺損、缺血性腦中風、中風後、急性輻射症候群、肺病、關節炎、骨再生或其組合。在一個態樣中，疾病或病症係葡萄膜炎。在另一態樣中，疾病或病症係自體免疫病症(例如，多發性硬化)或抵抗同種異體細胞之免疫反應。

本發明進一步涵蓋治療骨質流失或軟骨損傷之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之本文所述間葉基質細胞或間葉基質細胞製劑。間葉基質細胞可與同種異體或同源移植細胞或組織(例如，視網膜色素上皮細胞、視網膜細胞、角膜細胞或肌細胞)組合投與。

本發明包含培養產生MSC製劑之血管母細胞之方法，儘

管增加群體倍增次數，該等MSC仍保持效能。當向需要此投與之哺乳動物宿主投與時，本發明之間葉基質細胞之醫藥製劑顯示經改良治療性質。

【實施方式】

本發明係關於自培養血管母細胞產生間葉基質細胞、間葉基質細胞製劑之方法、培養血管母細胞之方法及利用間葉基質細胞治療病狀之方法。

本發明方法(其中血管母細胞培養物與先前技術方法相比產生增加之間葉基質細胞之產率)比先前技術方法更有效地產生實質上無ESC之間葉基質細胞。本發明之血管母細胞源間葉基質細胞保持新穎幼年型表型，如藉由特定標記物之表現或其缺乏所定義。

在某些實施例中，MSC製劑(例如具有至少 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個或甚至 10^6 個MSC之培養物)之平均端粒長度可為ESC及/或人類iPS細胞之平均端粒長度(或ESC及/或人類iPS細胞群體之平均值)的至少30%，且較佳為ESC及/或人類iPS細胞之平均端粒長度(或ESC及/或人類iPS細胞群體之平均值)的至少40%、50%、60%、70%、80%或甚至90%。例如，該ESC及/或人類iPS細胞(或該ESC及/或人類iPS細胞群體)可為分化出該等MSC細胞之細胞或細胞群體。

就群體而言，MSC製劑之平均末端限制片段長度(TRF)可比4 kb長，且較佳比5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、11 kb、12 kb或甚至13 kb長。在實例性實施例中，製

劑之MSC之平均TRF為10 kb或更長。

在某些實施例中，MSC製劑(例如具有至少 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個或甚至 10^6 個MSC之培養物)之複製壽命大於自其他來源獲得之MSC製劑(例如，源自捐贈人類組織(例如胎兒、嬰兒、兒童、青少年或成人組織)之培養物)之複製壽命。可藉由在複製衰老(即，其中在下一倍增或傳代前培養中之超過10%、20%、30%、40%或甚至50%之細胞衰老)前測定在培養中之群體倍增或傳代數來評價複製壽命。例如，標的MSC製劑之複製壽命可比源自捐贈人類組織(尤其源自成人骨髓或成人脂肪組織)之MSC製劑之複製壽命多至少10次倍增，且較佳為至少20次、30次、40次、50次、60次、70次、80次、90次或甚至100次群體倍增。在某些實施例中，MSC製劑之複製壽命可允許在超過50%細胞衰老及/或分化成非MSC細胞類型(例如纖維母細胞)前至少傳代8次，且更佳在達到該點前至少傳代10次、12次、14次、16次、18次或甚至20次。在某些實施例中，在超過50%細胞衰老及/或分化成非MSC細胞類型(例如纖維母細胞)前MSC製劑之複製壽命可允許之傳代次數係成人骨髓源MSC製劑及/或脂肪源MSC製劑(例如，相等的開始細胞數)之至少2倍¹，且傳代次數更佳係至少4倍、6倍、8倍或甚至10倍。

在某些實施例中，本發明MSC製劑(例如具有至少 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個或甚至 10^6 個MSC之培養物)相對於源自其他來源之傳代1(P1)、傳代2(P2)、傳代3(P3)、傳代4(P4)

及/或傳代 5(P5)MSC 製劑(例如，源自捐贈人類組織(例如，胎兒、嬰兒、兒童、青少年或成人組織)之培養物)且尤其骨髓源 MSC 及脂肪源 MSC 具有在統計學上顯著降低之參與細胞週期調節及衰老之蛋白之含量及/或酶促活性。例如，標的 MSC 製劑之蛋白酶體 26S 亞單位非 ATPase 調節亞單位 11(PSMD11)蛋白含量小於來自捐贈人類組織(尤其源自成人骨髓或成人脂肪組織)之 MSC 之含量的 75%，且甚至更佳小於 60%、50%、40%、30%、20% 或甚至 10%。

在某些實施例中，本發明之 MSC 製劑(例如具有至少 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個或甚至 10^6 個 MSC 之培養物)相對於源自其他來源之傳代 1(P1)、傳代 2(P2)、傳代 3(P3)、傳代 4(P4)及/或傳代 5(P5)MSC 製劑(例如，源自捐贈人類組織(例如胎兒、嬰兒、兒童、青少年或成人組織)之培養物)且尤其骨髓源 MSC 及脂肪源 MSC 具有在統計學上顯著降低之參與細胞能量及/或脂質代謝之蛋白之含量及/或酶促活性。為闡釋，對於一或多種參與 ATP 或 NADPH 合成代謝途徑之蛋白而言，標的 MSC 製劑之蛋白含量小於來自捐贈人類組織(尤其源自成人骨髓或成人脂肪組織)之 MSC 中之含量的 90%，且甚至更佳小於 60%、50%、40%、30%、20% 或甚至 10%，該等代謝途徑係(例如)糖酵解(例如果糖-二磷酸醛縮酶 A，ALDOA；醛-酮還原酶家族 1 成員 A1，AKR1A1)；甘油醛-3-磷酸，GAPDH)、三羧酸循環(TCA 循環)(例如異檸檬酸去氫酶 1，IDH1)、戊糖磷酸途徑(例如葡萄糖-6-磷酸去氫酶，G6PD)及葡糖醛酸生物合成途徑中 UDP-葡萄糖

之生物合成(例如UDP-葡萄糖6-去氫酶，UGDH)。為進一步闡釋，對於一或多種參與脂質代謝之蛋白(例如烯醯基-CoA水合酶短鏈1 (ECHS1)及/或乙醯基-CoA乙醯基轉移酶(ACAT2))而言，標的MSC製劑之蛋白含量小於來自捐贈人類組織(尤其源自成人骨髓或成人脂肪組織)之MSC中之含量的90%，且甚至更佳小於60%、50%、40%、30%、20%或甚至10%。

在某些實施例中，本發明MSC製劑(例如具有至少 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個或甚至 10^6 個MSC之培養物)相對於源自其他來源之傳代1(P1)、傳代2(P2)、傳代3(P3)、傳代4(P4)及/或傳代5(P5)MSC製劑(例如，源自捐贈人類組織(例如，胎兒、嬰兒、兒童、青少年或成人組織)之培養物)且尤其骨髓源MSC及脂肪源MSC具有在統計學上顯著降低之參與細胞凋亡之蛋白之含量及/或酶促活性。為闡釋，對於一或多種蛋白膜聯蛋白A1(ANXA1)、A2(ANXA2)、A5(ANXA5)、電壓依賴性陰離子選擇性通道蛋白1(VDAC1)及/或甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAPDH)而言，標的MSC製劑之蛋白含量小於來自捐贈人類組織(尤其源自成人骨髓或成人脂肪組織)之MSC中之含量的90%，且甚至更佳小於60%、50%、40%、30%、20%或甚至10%。

不受理論限制，吾人相信，由本發明之血管母細胞源MSC所展示參與細胞能量及/或脂質代謝及/或凋亡之蛋白之含量及/或酶促活性的統計學顯著差異至少部分地歸因於製劑之同源性質。例如，本發明血管母細胞源MSC具有

同源MHC基因表現，即，完全MHC匹配，此與成人源MSC庫(其中細胞係源自多個不同供體，即，MHC錯配)不同。MSC之治療劑量係約2,000,000個至8,000,000個細胞/kg(或約130,000,000個至500,000,000個細胞/劑量)。

定義

本文所用「多能細胞」泛指能夠進行延長或實際上無限期活體外增殖，同時保持其未分化狀態，展現穩定(較佳正常)核型且具有在合適條件下分化成所有三個胚層(即，外胚層、中胚層及內胚層)之能力的細胞。通常多能細胞(a)在移植於免疫缺陷(SCID)小鼠中時能夠誘導畸胎瘤；(b)能夠分化成所有三個胚層之細胞類型(例如，外胚層細胞類型、中胚層細胞類型及內胚層細胞類型)；且(c)表現至少一種hES細胞標記物(例如Oct-4、鹼性磷酸酶、SSEA 3表面抗原、SSEA 4表面抗原、NANOG、TRA 1 60、TRA 1 81、SOX2、REX1)。實例性多能細胞包括(但不限於)ES細胞、iPS細胞、自胚胎生殖(EG)細胞(例如，藉由在FGF-2、LIF及SCF存在下培養)產生之多能細胞、孤雌生殖ES細胞、自經培養內細胞團細胞產生之ES細胞、自分裂球產生之ES細胞及藉由核轉移(例如，體細胞核轉移至接受者卵母細胞中)產生之ES細胞。可產生實例性多能細胞而不破壞胚胎。例如，可自所得細胞產生iPS細胞而不破壞胚胎。進一步例如，ES細胞可自經生檢分裂球(其可達成而不損害其餘胚胎)產生；視情況，其餘胚胎可經極冷保藏，培養及/或植入適宜宿主中。

本文所用「胚胎(Embryo或embryonic)」泛指尚未植入母體宿主子宮膜中之發育中之細胞團。「胚胎細胞」係自胚胎分離或含於其中之細胞。此亦包括早在兩細胞期時獲得之分裂球及聚集分裂球。

本文所用「胚胎幹細胞」(ES細胞或ESC)泛指已連續傳代為細胞系且源自胚胎(例如，源自囊胚或一或多個分裂球之內細胞團(視情況不破壞胚胎其餘部分))之多能細胞。胚胎幹細胞可在產生本文所述血管母細胞之方法中用作多能幹細胞。許多產生ES細胞之方法為業內已知。ES細胞可源自藉由任何方法(例如利用精子或精子DNA使卵細胞受精、核轉移或孤雌生殖)產生之胚胎。例如，胚胎幹細胞亦包括藉由體細胞核轉移(即使在方法中利用非胚胎細胞時)產生之細胞。例如，ES細胞可源自囊胚期胚胎之ICM以及源自一或多個分裂球之胚胎幹細胞。此等胚胎幹細胞可自藉由受精或藉由無性手段(包括體細胞核轉移(SCNT)、孤雌生殖及雄核生殖)產生之胚胎物質產生。其他實例性多能幹細胞包括經誘導多能幹細胞(iPS細胞)，其係藉由使體細胞與一或多種重新編程(reprogramming)因子接觸將該細胞重新編程來產生。例如，重新編程因子可由細胞表現，例如自添加至細胞之外源核酸，或自對諸如下等因子有反應之內源基因表現：促進或誘導該基因表現之小分子、微RNA或諸如此類(參見Suh及Blomch, Development 138, 1653-1661 (2011); Miyoshi等人, Cell Stem Cell (2011), doi:10.1016/j.stem.2011.05.001; Sancho-

Martinez等人，*Journal of Molecular Cell Biology* (2011) 1-3；Anokye-Danso等人，*Cell Stem Cell* 8, 376-388，2011年4月8日；Orkin及Hochedlinger, *Cell* 145, 835-850，2011年6月10日，該等文獻中之每一者皆以整體引用方式併入本文中)。重新編程因子可自外源來源藉由(例如)添加至培養基來提供，且可藉由業內已知方法引入細胞中，例如經由偶合至細胞進入肽、蛋白或核酸轉染試劑、脂質轉染、電穿孔、生物彈射粒子遞送系統(基因槍)、微注射及諸如此類。iPS細胞可利用胎兒體細胞、出生後體細胞、新生兒體細胞、青少年體細胞或成人體細胞產生。在某些實施例中，可用於將體細胞重新編程成多能幹細胞之因子包括(例如)Oct4(有時稱作Oct 3/4)、Sox2、c-Myc與Klf4之組合。在其他實施例中，可用於將體細胞重新編程成多能幹細胞之因子包括(例如)Oct-4、Sox2、Nanog與Lin28之組合。在其他實施例中，藉由表現至少2種重新編程因子、至少3種重新編程因子或4種重新編程因子將體細胞重新編程。在其他實施例中，鑑別其他重新編程因子且將其單獨或與一或多種已知重新編程因子組合利用，以將體細胞重新編程成多能幹細胞。iPS細胞通常可藉由與胚胎幹細胞相同之標記物之表現來鑑別，但特定iPS細胞系可在其表現譜方面有所不同。可經由(例如)遺傳操縱、針對雜合性之自發損失進行篩選等產生在一或多個HLA基因中具有純合性或半合子狀態之ES細胞。胚胎幹細胞(不管其來源或用於產生其之特定方法)通常具有一或多種以下屬性：(i)

分化成所有三個胚層之細胞之能力、(ii)表現至少 Oct-4 及鹼性磷酸酶及(iii)在移植至免疫功能不全動物中時產生畸胎瘤之能力。可用於本發明實施例中之胚胎幹細胞包括(但不限於)人類 ES 細胞(「ESC」或「hES 細胞」)，例如 MA01、MA09、ACT-4、3 號、H1、H7、H9、H14 及 ACT30 胚胎幹細胞。其他實例性細胞系包括 NED1、NED2、NED3、NED4、NED5 及 NED7。亦參見 NIH Human Embryonic Stem Cell Registry。可利用之實例性人類胚胎幹細胞系係 MA09 細胞。MA09 細胞之分離及製備先前闡述於 Klimanskaya 等人 (2006) 「Human Embryonic Stem Cell lines Derived from Single Blastomeres.」 Nature 444: 481-485 中。根據本發明實例性實施例利用之人類 ES 細胞可根據 GMP 標準獲取並維持。

實例性 hES 細胞標記物包括(但不限於)：例如鹼性磷酸酶、Oct-4、Nanog、階段特異性胚胎抗原-3(SSEA-3)、階段特異性胚胎抗原-4(SSEA-4)、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E、Sox2、生長及分化因子 3(GDF3)、降低表現 1(reduced expression 1, REX1)、纖維母細胞生長因子 4(FGF4)、胚胎細胞特異性基因 1(ESG1)、發育多能性相關 2(DPPA2)、DPPA4、端粒酶反轉錄酶(hTERT)、SALL4、E-CADHERIN、簇命名 30 (Cluster designation 30, CD30)、Cripto (TDGF-1)、GCTM-2、起源因子(Genesis)、生殖細胞核因子及幹細胞因子(SCF 或 c-Kit 配體)。

首先可將 ESC 與鼠類胚胎飼養層細胞(MEF)細胞共培

育。可在共培養物中播種ESC前藉由暴露於絲裂黴素C使MEF細胞達成有絲分裂不活化，且因此MEF不在培養中繁殖。另外，可用顯微鏡檢查ESC細胞培養物，且可(例如)利用幹細胞切割工具、藉由雷射燒蝕或其他手段拾取並丟棄含有非ESC細胞形態之群落。通常，在播種用於類胚胎體形成之ESC之收穫點後，不利用額外MEF細胞。

本文所用「胚胎源細胞」(EDC)泛指桑椹胚源細胞、囊胚源細胞(包括內細胞團、胚盾或上胚層之細胞)或早期胚胎(包括原始內胚層、外胚層及中胚層及其衍生物)之其他多能幹細胞。「EDC」亦包括分裂球及來自聚集單分裂球之細胞團或來自不同發育階段之胚胎，但不包括已傳代為細胞系之人類胚胎幹細胞。

本文所用「多能幹細胞」泛指能夠進行延長或實際上無限期活體外增殖，同時保持其未分化狀態，展現穩定(較佳正常)核型且具有在合適條件下分化成全部三個胚層(即，外胚層、中胚層及內胚層)之能力的細胞。

本文所用「多能胚胎幹細胞」泛指以下細胞：(a)在移植於免疫缺陷(SCID)小鼠中時能夠誘導畸胎瘤；(b)能夠分化成所有三個胚層之細胞類型(例如，外胚層細胞類型、中胚層細胞類型及內胚層細胞類型)；且(c)表現至少一種分子胚胎幹細胞標記物(例如，表現Oct-4、鹼性磷酸酶、SSEA 3表面抗原、SSEA 4表面抗原、NANOG、TRA 1 60、TRA 1 81、SOX2、REX1)。實例性多能幹細胞可利用(例如)業內已知方法產生。實例性多能幹細胞包括源自囊

胚期胚胎之ICM之胚胎幹細胞以及源自一或多個分裂期或桑椹胚期胚胎之分裂球之胚胎幹細胞(視情況不破壞胚胎其餘部分)。此等胚胎幹細胞可自藉由受精或藉由無性手段(包括體細胞核轉移(SCNT)、孤雌生殖及雄核生殖)產生之胚胎物質產生。其他實例性多能幹細胞包括藉由使因子(本文稱作重新編程因子)組合表現或誘導其表現將體細胞重新編程所產生之經誘導多能幹細胞(iPS細胞)。iPS細胞可利用胎兒體細胞、出生後體細胞、新生兒體細胞、青少年體細胞或成人體細胞產生。在某些實施例中，可用於將體細胞重新編程成多能幹細胞之因子包括(例如)Oct4(有時稱作Oct 3/4)、Sox2、c-Myc與Klf4之組合。在其他實施例中，可用於將體細胞重新編程成多能幹細胞之因子包括(例如)Oct-4、Sox2、Nanog與Lin28之組合。在其他實施例中，藉由表現至少2種重新編程因子、至少3種重新編程因子或4種重新編程因子將體細胞重新編程。在其他實施例中，鑑別其他重新編程因子且將其單獨或與一或多種已知重新編程因子組合利用，以將體細胞重新編程成多能幹細胞。iPS細胞通常可藉由與胚胎幹細胞相同之標記物之表現來鑑別，但特定iPS細胞系可在其表現譜方面有所不同。

實例性ESC細胞標記物包括(但不限於)：例如鹼性磷酸酶、Oct-4、Nanog、階段特異性胚胎抗原-3(SSEA-3)、階段特異性胚胎抗原-4(SSEA-4)、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E、Sox2、生長及分化因子3(GDF3)、降低表現

1、纖維母細胞生長因子4(FGF4)、胚胎細胞特異性基因1(ESG1)、發育多能性相關2(DPPA2)、DPPA4、端粒酶反轉錄酶(hTERT)、SALL4、E-CADHERIN、簇命名30、Cripto(TDGF-1)、GCTM-2、起源因子、生殖細胞核因子及幹細胞因子(SCF或c-Kit配體)。

本文所用「效能」泛指產生界定效應之試劑(在此情形下為血管母細胞源MSC)之(例如)莫耳濃度。效能可以有效濃度(EC50)界定，其不涉及最大效應之量測，而是涉及沿劑量反應曲線之濃度軸於不同位點處之效應之量測。亦可自分級(EC50)或量子劑量-反應曲線(ED50、TD50及LD50)測定效能；然而，較佳藉由EC50來量測效能。術語「EC50」係指藥物、抗體或毒物在某一指定暴露時間後誘導在基線與最大效應間之中途之反應之濃度。因此，分級劑量反應曲線之EC50代表化合物之觀察到50%最大效應之濃度。量子劑量反應曲線之EC50代表化合物在指定暴露持續時間後50%群體展現反應之濃度。EC50可利用以下來測定：動物研究，其中界定動物模型顯示因應藥物施加之可量測生理變化；基於細胞之分析，其利用指定細胞系統，且在添加藥物時，顯示可測量生物學反應；及/或酶促反應，其中藥物之生物學活性可藉由在由藥物促進之化學反應後產物之累積來量測。較佳地，利用免疫調節分析來測定EC50。此等免疫調節分析之非限制性實例包括細胞內細胞介素、細胞毒性、調節能力、細胞信號傳導能力、增殖能力、細胞凋亡評估及其他分析。

本文所用「治療(Therapy、therapeutic、treating、treat或treatment)」泛指治療疾病，阻礙或降低疾病或其臨床症狀發展及/或緩解疾病，引起疾病或其臨床症狀消退。療法涵蓋疾病、疾病之體徵及/或症狀之預防(prophylaxis, prevention)、治療、治癒、醫治、降低、減輕及/或使其緩解。療法涵蓋具有進行中之疾病體徵及/或症狀(例如，失明、視網膜退化)之患者之體徵及/或症狀的減輕。療法亦涵蓋「預防(prophylaxis及prevention)」。預防包括預防在治療患者之疾病或降低患者之疾病之發生率或嚴重程度後出現之疾病。術語「降低」出於治療目的，泛指體徵及/或症狀之臨床顯著降低。療法包括治療再發或復發體徵及/或症狀(例如，視網膜變性、失明)。療法涵蓋(但不限於)排除體徵及/或症狀在任何時間之出現以及降低現有體徵及/或症狀及消除現有體徵及/或症狀。療法包括治療慢性疾病(「維持」)及急性疾病。例如，治療包括治療體徵及/或症狀(例如，失明、視網膜變性)或預防其再發或復發。

為維持調節性依從性，MSC庫必須維持足量細胞供應，例如，為提供足量細胞來治療至少幾百至10,000名患者，MSC庫必須具有至少500億個MSC。本發明涵蓋GMP依從及/或極冷保藏之MSC庫。在一個態樣中，本發明之MSC製劑包含至少 10^{10} 個血管母細胞源MSC。在另一態樣中，本發明提供包含至少 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個或 10^{14} 個血管母細胞源MSC之MSC製劑。

本文所用「將病狀正常化」係指將因疾病所致之異常結構及/或功能逆轉成更正常狀態。正常化表明，藉由校正因疾病所致組織、器官、細胞類型等之結構及/或功能異常，可控制並改良病狀進展。例如，在利用本發明ESC-MSC治療後，可改良、校正及/或逆轉免疫系統因自體免疫病症(例如，MS)所致之異常。

經誘導多能幹細胞

其他實例性多能幹細胞包括藉由因子(「重新編程因子」)組合表現或誘導表現使體細胞重新編程所產生之經誘導多能幹細胞(iPS細胞)。iPS細胞可使用胎兒體細胞、出生後體細胞、新生兒體細胞、青少年體細胞或成人體細胞產生。iPS細胞可自細胞庫獲得。或者，iPS細胞可在開始分化成RPE細胞或另一細胞類型之前新產生(藉由業內已知方法)。製備iPS細胞可為產生分化細胞之初始步驟。iPS細胞可使用來自特定患者或匹配供體之物質特定地產生，目標在於產生組織匹配RPE細胞。iPS細胞可由在預定接受者中實質上無免疫原性之細胞產生，例如由自體細胞或由與預定接受者組織相容之細胞產生。

經誘導多能幹細胞可藉由一或多種重新編程因子在體細胞中表現或誘導表現產生。體細胞係纖維母細胞，例如皮膚纖維母細胞、滑液纖維母細胞或肺纖維母細胞，或非纖維母細胞性體細胞。藉由表現至少1次、2次、3次、4次、5次將體細胞重新編程。重新編程因子可選自Oct 3/4、Sox2、NANOG、Lin28、c Myc及Klf4。重新編程因子之表

現可由體細胞與至少一種誘導重新編程因子表現之劑(例如小有機分子劑)接觸而誘導。

亦可使用組合方法將體細胞重新編程，其中表現(例如使用病毒載體、質粒及諸如此類)重新編程因子及誘導(例如使用小有機分子)重新編程因子之表現。例如，重新編程因子可表現於使用病毒載體(例如反轉錄病毒載體或慢病毒載體)感染之體細胞中。此外，重新編程因子可使用非整合載體(例如游離型(episomal)質粒)表現於體細胞中。參見例如 Yu 等人，*Science*. 2009 年 5 月 8 日；324 (5928): 797-801，其以整體引用方式併入本文中。當使用非整合載體表現重新編程因子時，該等因子可表現於使用電穿孔、用該等載體對體細胞轉染或轉化之細胞中。例如，在小鼠細胞中，使用整合病毒載體表現 4 種因子(Oct3/4、Sox2、c myc 及 Klf4)足以將體細胞重新編程。在人類細胞中，使用整合病毒載體表現 4 種因子(Oct3/4、Sox2、NANOG 及 Lin28)足以將體細胞重新編程。

在細胞中表現重新編程因子後，可培養該等細胞。具有 ES 特性之細胞隨時間而出現在培養皿中。可基於(例如)ES 形態或基於可選或可檢測標記物之表現來選擇並繼代培養該等細胞。該等細胞可經培養以產生類似於 ES 細胞之細胞培養物，該等 ES 細胞係推定 iPS 細胞。

為確認 iPS 細胞之多能性，可在一或多種多能性分析中測試該等細胞。例如，可針對 ES 細胞標記物之表現來測試該等細胞；可針對在移植至 SCID 小鼠中時產生畸胎瘤之能

力來評估該等細胞；可針對分化以產生所有三個胚層之細胞類型之能力來評估該等細胞。在獲得多能iPS細胞後，其可用於產生RPE細胞。

血管母細胞

血管母細胞具有多能性且用作造血細胞譜系與內皮細胞譜系二者之常見前體。在胚胎發育期間，人們相信其係以在早期中胚層發育期間出現且定殖於原始血島之過渡細胞類型形式產生(Choi等人 *Development* 125 (4): 725-732 (1998))。在此處後，血管母細胞能夠產生原始造血細胞與最終造血細胞二者、HSC及內皮細胞(Mikkola等人，*J. Hematother. Stem Cell Res* 11(1): 9-17 (2002))。

血管母細胞可在活體外源自小鼠ESC (Kennedy等人，*Nature* (386): 488-493 (1997)；Perlingeiro等人，*Stem Cells* (21): 272-280 (2003))與人類ESC(參考文獻14、15，Yu等人，*Blood* 2010 116: 4786-4794))二者。其他研究聲稱已自臍帶血(Bordoni等人，*Hepatology* 45 (5) 1218-1228)、來自周邊血液之循環性CD34-lin-CD45-CD133-細胞(Ciraci等人，*Blood* 118: 2105-2115)及自小鼠子宮(Sun等人，*Blood* 116 (16): 2932-2941 (2010))分離血管母細胞。已經由培養及分化在液體培養中生長之細胞簇、之後使細胞在含有各種細胞介素及生長因子之半固體培養基中生長來獲得小鼠源血管母細胞與人類ESC源血管母細胞二者(Kennedy, Perlingeiro, 參考文獻14、15)；亦參見，美國專利第8,017,393號，其以整體引用方式併入本文中。可

自該等已知方法中之任一者獲取或獲得可用於本文所述方法中之血管母細胞。例如，可藉由在非附著條件下(例如，在低附著基質上或在「懸滴」中)培養多能細胞來形成類胚胎體。在該等培養物中，ES細胞可形成命名為類胚胎體之細胞塊或簇。參見Itskovitz-Eldor等人，Mol Med. 2000年2月；6(2):88-95，其以整體引用方式併入本文中。通常，類胚胎體首先形成多能細胞之實心塊或簇，且一些類胚胎體隨時間而開始包括流體填充腔，前者在文獻中稱作「簡單」EB且後者稱作「囊性」類胚胎體。同前。該等EB中(實心形式與囊性形式二者)之細胞可分化且隨時間而產生數目漸增之細胞。視情況，隨後可將EB作為附著培養物培養並使其形成生長物。同樣，過度生長並形成多層細胞群體之多能細胞可隨時間而分化。

在一個實施例中，藉由包含以下之步驟來產生血管母細胞：(a)將ESC系培養2天、3天、4天、5天、6天或7天以形成細胞簇，及(b)誘導該等細胞簇分化成血管母細胞。在另一實施例中，在基於富含細胞介素之無血清甲基纖維素之培養基中培養步驟(b)中之細胞簇(14、15)。

在一個實施例中，藉由包含以下之步驟來產生血管母細胞：(a)將選自由MA09、H7、H9、MA01、HuES3及H1gfp組成之群之ESC系培養2天、3天、4天、5天、6天或7天以形成細胞簇，及(b)藉由在基於富含細胞介素之無血清甲基纖維素之培養基中培養來誘導該等細胞簇分化成血管母細胞。

在另一實施例中，藉由誘導本文所述任何多能細胞來產生血管母細胞。在再一實施例中，藉由誘導選自包含以下之群之多能細胞來產生血管母細胞：囊胚、平鋪ICM、一或多個分裂球或植入前期胚胎或類胚胎結構之其他部分(不管藉由受精、體細胞核轉移(SCNT)、孤雌生殖、雄核生殖抑或其他有性或無性手段產生)，以及經由重新編程獲取之ESC(例如，iPS細胞)。在又一實施例中，自iPS細胞產生血管母細胞，其中iPS細胞係產生利用外源添加因子或其他業內已知方法，例如蛋白或微RNA(參見Zhou等人，細胞Stem細胞(4): 1-4, 2009；Miyoshi等人Cell Stem Cell (8): 1-6, 2011；Danso等人，Cell Stem Cell (8): 376-388, 2011)。

本發明包含新穎間葉基質細胞製劑(MSC)及利用血管母細胞產生MSC之方法。在一個實施例中，在利用無血清甲基纖維素培養基與一或多種選自包含以下之群之成份培養至少6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天或20天後收穫血管母細胞：青黴素/鏈黴素(pen/strp)、EX-CYTE®生長補充物(水溶性濃縮物，包含9.0 g/L至11.0 g/L膽固醇及13.0 g/L至18.0 g/L脂蛋白及脂肪酸，pH 7-8.4)、Flt3-配體(FL)、血管內皮生長因子(VEGF)、血小板生成素(TPO)及鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、幹細胞源因子(SCF)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、介白素3(IL3)及介白素6(IL6)，其中誘導選自包含以下之群之多能細胞：囊胚、

平鋪 ICM、一或多個分裂球或植入前期胚胎或類胚胎結構之其他部分(不管藉由受精、體細胞核轉移(SCNT)、孤雌生殖、雄核生殖抑或其他有性或無性手段產生)，以及經由重新編程獲取之細胞(iPS細胞)。在本發明之較佳實施例中，在(例如)無血清甲基纖維素與先前實施例之成份中培養6天與14天之間收穫血管母細胞。在較佳實施例中，該等成份以下列濃度存於該培養基中：50 ng/ml Flt3-配體(FL)、50 ng/ml血管內皮生長因子(VEGF)、50 ng/ml血小板生成素(TPO)及20 ng/ml鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、50 ng/ml幹細胞源因子(SCF)、20 ng/ml顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、20 ng/ml介白素3(IL3)、20 ng/ml介白素6(IL6)、50 ng/ml FL、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO及30 ng/ml bFGF。

在另一實施例中，將實質上由血管母細胞構成之細胞簇係再平鋪並培養至少8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天、35天或36天，以形成間葉基質細胞製劑。在一個實施例中，藉由包含以下之步驟來產生間葉基質細胞：(a)將ESC培養8天至12天，(b)收穫形成細胞簇之血管母細胞，(c)再平鋪步驟(b)之血管母細胞，及(d)將步驟(c)之血管母細胞培養介於14天與30天之間。

在一個實施例中，收穫血管母細胞，在無飼養層條件下

在液體培養基中再平鋪並培養，其中在培養物中不含有飼養細胞層，例如小鼠胚胎纖維母細胞、OP9細胞或熟習此項技術者已知之其他細胞類型。在較佳實施例中，在細胞外基質上培養血管母細胞。在再一較佳實施例中，在細胞外基質上培養血管母細胞，其中該基質包含來自Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)小鼠肉瘤細胞之可溶性製劑，該可溶性製劑在室溫下膠凝以形成重構基底膜(基質膜)。在又一較佳實施例中，根據包含以下之步驟來產生血管母細胞：(a)在基質膠上將該等血管母細胞培養至少7天，(b)將步驟(a)之血管母細胞轉移至未經塗佈組織培養板，及將步驟(b)之該等血管母細胞進一步培養介於約7天至14天之間)。在包含一或多種選自由以下組成之群之因子之基質上培養本發明血管母細胞：轉化生長因子 β (TGF- β)、表皮生長因子(EGF)、類胰島素生長因子1、牛纖維母細胞生長因子(bFGF)及/或血小板源生長因子(PDGF)、人類基底膜提取物(BME)(例如，Cultrex BME, Trevigen)或EHS基質、層黏連蛋白、纖連蛋白、玻連蛋白、蛋白聚糖、內動蛋白、膠原(例如，膠原I、膠原IV)及硫酸乙醯肝素。該等基質或基質組份可屬於哺乳動物或更具體而言人類起源。在一個實施例中，在基質膠塗佈板上在包含血清之液體培養基中培養血管母細胞，其中該培養基可包含選自包含以下之列表之成份：補充有10-20%胎牛血清之 α MEM(Sigma-Aldrich)(α MEM+20% FCS)、補充有10-20%熱不活化人類AB血清之 α MEM及補充有10-20%熱不活化

AB人類血清之IMDM。

藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞

本發明包含經改良間葉基質細胞。利用培養血管母細胞之經改良方法自血管母細胞產生本發明間葉基質細胞。

本發明間葉基質細胞與直接源自ESC之間葉基質細胞相比保持更高程度之效能，且不凝塊或凝塊顯著更少。在本發明之一實施例中，根據本發明任一或多種方法產生之間葉基質細胞製劑與直接源自ESC之間葉基質細胞相比保持更高程度之效能，且不凝塊或凝塊顯著更少。

本發明包含培養產生間葉基質細胞製劑之血管母細胞之方法，其中該等間葉基質細胞保持幼年型表型。當向需要治療之哺乳動物宿主投與時，本發明之間葉基質細胞之醫藥製劑顯示經改良治療性質。

本發明之一實施例包含藉由培養人類血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑。本發明之再一實施例包含藉由培養人類血管母細胞產生間葉基質細胞製劑之方法。在本發明方法之一實施例中，在無飼養層條件下培養該等人類血管母細胞，然後將其平鋪於基質上。在本發明之又一實施例中，該基質係選自包含以下之群：轉化生長因子 β (TGF- β)、表皮生長因子(EGF)、類胰島素生長因子1、牛纖維母細胞生長因子(bFGF)、血小板源生長因子(PDGF)、層黏連蛋白、纖連蛋白、玻連蛋白、蛋白聚糖、內動蛋白、膠原、膠原I、膠原IV、硫酸乙醯肝素、來自Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)小鼠肉瘤細胞之可溶性製劑、基質膠及

人類基底膜提取物。在又一實施例中，該基質可源自哺乳動物或人類起源。

在另一實施例中，在包含血清或血清替代物(例如補充有20%胎牛血清之 α MEM)之培養基中培養血管母細胞。在再一實施例中，在基質上將血管母細胞培養約9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天。在本發明之又一實施例中，藉由包含以下之步驟來產生間葉基質細胞製劑：(a)在基質膠上將血管母細胞培養約7天，(b)將步驟(a)之血管母細胞轉移離開基質膠並使血管母細胞在未經塗佈組織培養皿上再生長9天至100天、約9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、30天、35天、40天、50天、60天、70天、80天、90天或100天。

在本發明之一實施例中，藉由在包含血清或血清替代物(例如補充有20%胎牛血清之 α MEM)之培養基中培養血管母細胞來產生間葉基質細胞製劑。在本發明之再一實施例中，在基質上將該等血管母細胞培養約9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天。

在本發明之一實施例中，自ESC分化血管母細胞。在本發明之再一實施例中，自ESC分化先前實施例之血管母細

胞，其中該等ESC係選自包含以下之群：iPS、MA09、H7、H9、MA01、HuES3、H1gfp、內細胞團細胞及分裂球。

本發明之一實施例包含藉由自ESC分化血管母細胞之方法產生之間葉基質細胞製劑。在本發明之再一實施例中，自ESC分化先前實施例之血管母細胞，其中該等ESC係選自包含以下之群：iPS、MA09、H7、H9、MA01、HuES3、H1gfp、內細胞團細胞及分裂球。

在本發明之一實施例中，藉由依照包含以下之步驟自ESC分化血管母細胞：(a)在(例如)血管內皮生長因子(VEGF)及/或成骨蛋白4(BMP-4)存在下培養ESC，以形成細胞簇；(b)在至少一種生長因子(例如，鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、血管內皮生長因子(VEGF)及成骨蛋白4(BMP-4)、幹細胞因子(SCF)、Flt 3L(FL)、血小板生成素(TPO)及/或tPTD-HOXB4)存在下培養該等細胞簇，該至少一種生長因子之量足以誘導該等細胞簇分化成血管母細胞；及(c)在包含至少一種其他生長因子(例如，胰島素、轉鐵蛋白、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、介白素-3(IL-3)、介白素-6(IL-6)、顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、紅血球生成素(EPO)、幹細胞因子(SCF)、血管內皮生長因子(VEGF)、成骨蛋白4(BMP-4)及tPTD-HOXB4)之培養基中培養該等血管母細胞，其中該至少一種其他生長因子係以足以擴增該培養中之該等細胞簇之量提供，且其中視情況將銅添加至步驟(a)至(c)中之任一者。

在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞來產生間葉基質細胞製劑，其中藉由依照包含以下之步驟自ESC分化該等血管母細胞：(a)在起始該培養0至48小時內在血管內皮生長因子(VEGF)及成骨蛋白4(BMP-4)存在下培養ESC，以形成細胞簇；(b)在至少一種選自包含以下之群之生長因子存在下培養該等細胞簇：鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、血管內皮生長因子(VEGF)、成骨蛋白4(BMP-4)，幹細胞因子(SCF)、Flt 3L (FL)、血小板生成素(TPO)及tPTD-HOXB4，該至少一種生長因子之量足以誘導該等細胞簇分化成血管母細胞；及(c)在包含至少一種選自包含以下之群之其他生長因子之培養基中培養該等血管母細胞：胰島素、轉鐵蛋白、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、介白素-3(IL-3)、介白素-6(IL-6)、顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、紅血球生成素(EPO)、幹細胞因子(SCF)、血管內皮生長因子(VEGF)、成骨蛋白4(BMP-4)及tPTD-HOXB4，其中該至少一種其他生長因子係以足以擴增該培養中之人類細胞簇之量提供。

在另一實施例中，藉由包含以下之步驟來產生間葉幹細胞製劑：(a)在至少6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天誘導ESC分化成血管母細胞後收穫該等血管母細胞，及(b)收穫在以下時間內誘導來自步驟(a)之該等血管母細胞分化成間葉細胞所產生之該等間葉基質細胞：約25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天、35天、36天、37天、38天、39天、40

天、41天、42天、43天、44天、45天、46天、47天、48天、49天或50天。

在又一實施例中，在培養血管母細胞約26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天或35天內自約200,000個血管母細胞產生至少80,000,000個、85,000,000個、90,000,000個、95,000,000個、100,000,000個、125,000,000個或150,000,000個間葉基質細胞之製劑，其中該等間葉基質細胞製劑包含小於約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%人類胚胎幹細胞。在又一實施例中，在培養血管母細胞約26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天或35天內自約200,000個血管母細胞產生至少80,000,000個、85,000,000個、90,000,000個、100,000,000個、125,000,000個或150,000,000個間葉基質細胞。

在本發明方法之一實施例中，間葉基質細胞製劑實質上在人類胚胎幹細胞方面經純化。在本發明方法之再一實施例中，間葉基質細胞製劑實質上在人類胚胎幹細胞方面經純化，以使得該製劑包含至少約90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%間葉基質細胞。

在本發明之另一實施例中，藉由本發明任一或多種方法產生之間葉基質細胞製劑在引入宿主中時，不形成畸胎瘤。

在本發明之另一實施例中，在約15天培養後，至少50%間葉基質細胞製劑對CD105或CD73為陽性。在本發明之另一實施例中，在約15天培養後，根據本發明任一或多種方法產生之至少50%間葉基質細胞製劑對CD105或CD73為陽性。在本發明之再一實施例中，在培養約20天內，至少80%間葉基質細胞製劑對CD105及CD73為陽性。在本發明之又一實施例中，在培養約20天內，根據本發明任一或多種方法產生之至少80%間葉基質細胞製劑對CD105及CD73為陽性。

間葉基質細胞製劑

在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞之期望表型與藉由ESC培養獲得之間葉基質細胞相比呈遞更快(參見圖5)。在本發明之再一實施例中，藉由血管母細胞培養獲得之間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞之期望表型與藉由ESC培養獲得之間葉基質細胞相比呈遞更快，且其中該期望表型係藉由至少兩種選自包含以下之群之標記物之表現來界定：CD9、CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166及HLA-abc。

本發明之再一實施例包含間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞之表型係藉由至少兩種選自包含以下之群之標記物之表現來界定：CD9、CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166及HLA-abc。本發明之又一實施例包含間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞之表型係藉由至少兩種選自包含以下之群之標記物之表現來界定：CD9、CD13、CD29、CD44、CD73、CD90及CD105，且其中該等間葉基質細胞不表現CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD22、CD33、CD36、CD38、CD61、CD62E及CD133。

在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%間葉基質細胞呈遞藉由以下界定之表型：在約15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天培養後，標記物CD9、CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166及HLA-abc之表現。在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%間葉基質細胞呈遞藉由以下界定之表型：在約15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天培養後，至少兩種選自包含CD9、CD13、CD29、

CD44、CD73、CD90、CD105、CD166及HLA-abc之群之標記物之表現以及CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD22、CD33、CD36、CD38、CD61、CD62E、CD133及Stro-1之表現之缺乏。先前實施例，其中該表型進一步係藉由選自包含以下之群之標記物來界定：AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1及CXCL1。

在本發明較佳方法中，其中源自血管母細胞之間葉基質細胞之數目係在約30天間葉基質細胞培養內源自約 2×10^5 個血管母細胞之約 8×10^7 個、 8.5×10^7 個、 9×10^7 個、 9.5×10^7 個、 1×10^8 個、 1.25×10^8 個或 1.5×10^8 個間葉基質細胞。在本發明之替代實施例中，間葉基質細胞可在約30天間葉基質細胞培養內自血管母細胞產生，且血管母細胞對間葉基質細胞之比率為約1:200、1:400、1:415、1:425、1:440；1:450、1:465、1:475、1:490及1:500。

在本發明之較佳實施例中，藉由血管母細胞培養獲得之間葉基質細胞之數目高於直接自ESC獲得之間葉基質細胞之數目。在本發明之再一較佳實施例中，藉由血管母細胞培養獲得之間葉基質細胞之數目係直接自ESC獲得之間葉基質細胞之數目的至少5倍、10倍、20倍、22倍(參見圖4)。

在本發明之另一實施例中，藉由血管母細胞培養獲得之間葉基質細胞製劑在引入哺乳動物宿主中時，不形成畸胎瘤。

本發明之一實施例包含利用本發明任一方法實施例藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑。本發明之一實施例包含利用本發明任一方法實施例藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑之表型係藉由任一或所有選自包含以下之群之標記物來界定：AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1及CXCL1。本發明之再一實施例包含利用本發明任一方法實施例藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑之表型係藉由任一或所有選自包含以下之群之標記物之存在來界定：AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1及CXCL1，且其中該製劑呈遞降低之IL-6及VEGF之表現。

本發明之一實施例包含利用本發明任一方法實施例藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑之表型係藉由任一或所有選自包含以下之群之標記物來界定：AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1、CXCL1、p16、p21、p53、活性含氧物、一氧化氮、糖皮質激素受體、端粒長度、RAMP、MEG3、IL13R2、S100A4、TREM1、HoxB3、HoxB7、MID1、SNAPC5、PPARG、S100A1、VIM、MYADM、PIM1、ANXA2、TIPIN、MYLIP、LAX1、EGR1、DGKA、TPBG、MGLL、EML1、MYO1B、LASS6、ROBO1、DKFZP586H2123、LOC854342、DOK5、UBE2E2、USP53、VEPH1、SLC35E1、ANXA2、HLA-E、CD59、BHLHB2、UCHL1、SUSP3、CREDBL2、OCRL、OSGIN2、SLEC3B、IDS、TGFB2、TSPAN6、

TM4SF1、MGLL、CD59、MAP4、CAST、LHFPL2、PLEKHM1、SAMD4A、VAMP1、ADD1、FAM129A、HPDC1、KLF11、DRAM、TREM140、BHLHB3、MGC17330、TBC1D2、KIAA1191、C5ORF32、C15ORF17、FAM791、CCDC104、PQLC3、EIF4E3、C7ORF41、DUSP18、SH3PX3、MYO5A、PRMT2、C8ORF61、SAMD9L、PGM2L1、HOM-TES-103、EPOR、TMEM112、CSGLCA-T、CRIP1、SULT1A3、STMN1、CCT8、SFRS10、CBX3、CBX1、FLJ11021、DDX46、ACADM、KIAA0101、TYMS、BCAS2、CEP57、TDG、MAP2K6、CSRP2、GLMN、HMGN2、HNRPR、EIF3S1、PAPOLA、SFRS10、TCF3、H3F3A、LOC730740、LYPLA1、UBE3A、SUM02、SHMT2、ACP1、FKBP3、ARL5A、GMNN、ENY2、FAM82B、RNF138、RPL26L1、CCDC59、PXMP2、POLR3B、TRMT5、ZNF639、MRPL47、GTPBP8、SUB1、SNHG1、ATPAF1、MRPS24、C16ORF63、FAM33A、EPSTL1、CTR9、GAS5、ZNF711、MTO1及CDP2。本發明之一實施例包含間葉基質細胞製劑，其中該製劑之表型係藉由任一或所有選自包含以下之群之標記物之存在來界定：AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1、CXCL1、p16、p21、p53、活性含氧物、一氧化氮、糖皮質激素受體、端粒長度、RAMP、MEG3、IL13R2、S100A4、TREM1、HoxB3、HoxB7、MID1、SNAPC5、PPARG、S100A1、VIM、

MYADM 、 PIM1 、 ANXA2 、 TIPIN 、 MYLIP 、 LAX1 、
 EGR1 、 DGKA 、 TPBG 、 MGLL 、 EML1 、 MYO1B 、
 LASS6 、 ROBO1 、 DKFZP586H2123 、 LOC854342 、
 DOK5 、 UBE2E2 、 USP53 、 VEPH1 、 SLC35E1 、 ANXA2 、
 HLA-E 、 CD59 、 BHLHB2 、 UCHL1 、 SUSP3 、 CREDBL2 、
 OCRL 、 OSGIN2 、 SLEC3B 、 IDS 、 TGFBR2 、 TSPAN6 、
 TM4SF1 、 MGLL 、 CD59 、 MAP4 、 CAST 、 LHFPL2 、
 PLEKHM1 、 SAMD4A 、 VAMP1 ADD1 、 FAM129A 、
 HPDC1 、 KLF11 、 DRAM 、 TREM140 、 BHLHB3 、
 MGC17330 、 TBC1D2 、 KIAA1191 、 C5ORF32 、
 C15ORF17 、 FAM791 、 CCDC104 、 PQLC3 、 EIF4E3 、
 C7ORF41 、 DUSP18 、 SH3PX3 、 MYO5A 、 PRMT2 、
 C8ORF61 、 SAMD9L 、 PGM2L1 、 HOM-TES-103 、 EPOR 、
 TMEM112 、 CSGICA-T 、 CRIP1 、 SULT1A3 、 STMN1 、
 CCT8 、 SFRS10 、 CBX3 、 CBX1 、 FLJ11021 、 DDX46 、
 ACADM 、 KIAA0101 、 TYMS 、 BCAS2 、 CEP57 、 TDG 、
 MAP2K6 、 CSRP2 、 GLMN 、 HMGN2 、 HNRPR 、 EIF3S1 、
 PAPOLA 、 SFRS10 、 TCF3 、 H3F3A 、 LOC730740 、
 LYPLA1 、 UBE3A 、 SUM02 、 SHMT2 、 ACP1 、 FKBP3 、
 ARL5A 、 GMNN 、 ENY2 、 FAM82B 、 RNF138 、 RPL26L1 、
 CCDC59 、 PXMP2 、 POLR3B 、 TRMT5 、 ZNF639 、
 MRPL47 、 GTPBP8 、 SUB1 、 SNHG1 、 ATPAF1 、
 MRPS24 、 C16ORF63 、 FAM33A 、 EPSTL1 、 CTR9 、
 GAS5 、 ZNF711 、 MTO1及CDP2 。

在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似含量之p53及p21蛋白，或其中p53之含量係p21的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在本發明之一實施例中，間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似含量之p53及p21蛋白，或其中p53之含量係p21的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在本發明之一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該醫藥製劑包含實質上類似含量之p53及p21蛋白，或其中p53之含量係p21的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之對p53及p21蛋白為陽性之細胞，或其中對p53為陽性之細胞之百分比係p21的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在本發明之一實施例中，間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之對p53及p21蛋白為陽性之細胞，或其中對p53為陽性之細胞之百分比係p21的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在本發明之一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該醫藥製劑包含實質上類似百分比之對p53及p21蛋白為陽性之細胞，或其中對p53為陽性之細胞之百分比係p21的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體之細胞，或其中對活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體為陽性之細胞之百分比係背景的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在本發明之一實施例中，間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體之細胞，或其中對活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體為陽性之細胞之百分比係背景的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在本發明之一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該醫藥製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體之細胞，或其中對活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體為陽性之細胞之百分比係背景的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

在本發明之一實施例中，提供藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1或CXCL1之細胞，或其中對活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體為陽性之細胞之百分比係背景的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在本發明之一實施例中，提供間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含

實質上類似百分比之具有背景含量之 AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1 或 CXCL1 之細胞，或其中對活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體為陽性之細胞之百分比係背景的 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍。在本發明之一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該醫藥製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之 AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1 或 CXCL1 之細胞，或其中對活性含氧物、一氧化氮或糖皮質激素受體為陽性之細胞之百分比係背景的 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍。

在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之選自包含以下之群之標記物的細胞：
 S100A1、VIM、MYADM、PIM1、ANXA2、RAMP、MEG3、IL13R2、S100A4、TREM1、DGKA、TPBG、MGLL、EML1、MYO1B、LASS6、ROBO1、DKFZP586H2123、LOC854342、DOK5、UBE2E2、USP53、VEPH1、SLC35E1、ANXA2、HLA-E、CD59、BHLHB2、UCHL1、SUSP3、CREDBL2、OCRL、OSGIN2、SLEC3B、IDS、TGFB2、TSPAN6、TM4SF1、MGLL、CD59、MAP4、CAST、LHFPL2、PLEKHM1、SAMD4A、VAMP1、ADD1、FAM129A、HPDC1、KLF11、DRAM、TREM140、BHLHB3、MGC17330、TBC1D2、KIAA1191、C5ORF32、C15ORF17、FAM791、

CCDC104 、 PQLC3 、 EIF4E3 、 C7ORF41 、 DUSP18 、 SH3PX3 、 MYO5A 、 PRMT2 、 C8ORF61 、 SAMD9L 、 PGM2L1 、 HOM-TES-103 、 EPOR及 TMEM112 ， 或其中對選自包含以下之群之標記物為陽性之細胞的百分比係背景的 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍：S100A1 、 VIM 、 MYADM 、 PIM1 、 ANXA2 、 RAMP 、 MEG3 、 IL13R2 、 S100A4 、 TREM1 、 DGKA 、 TPBG 、 MGLL 、 EML1 、 MYO1B 、 LASS6 、 ROBO1 、 DKFZP586H2123 、 LOC854342 、 DOK5 、 UBE2E2 、 USP53 、 VEPH1 、 SLC35E1 、 ANXA2 、 HLA-E 、 CD59 、 BHLHB2 、 UCHL1 、 SUSP3 、 CREDBL2 、 OCRL 、 OSGIN2 、 SLEC3B 、 IDS 、 TGFBR2 、 TSPAN6 、 TM4SF1 、 MGLL 、 CD59 、 MAP4 、 CAST 、 LHFPL2 、 PLEKHM1 、 SAMD4A 、 VAMP1 、 ADD1 、 FAM129A 、 HPDC1 、 KLF11 、 DRAM 、 TREM140 、 BHLHB3 、 MGC17330 、 TBC1D2 、 KIAA1191 、 C5ORF32 、 C15ORF17 、 FAM791 、 CCDC104 、 PQLC3 、 EIF4E3 、 C7ORF41 、 DUSP18 、 SH3PX3 、 MYO5A 、 PRMT2 、 C8ORF61 、 SAMD9L 、 PGM2L1 、 HOM-TES-103 、 EPOR 、 TMEM112 。 在本發明之一實施例中，間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之選自包含以下之群之標記物的細胞：DGKA 、 TPBG 、 MGLL 、 EML1 、 MYO1B 、 LASS6 、 ROBO1 、 DKFZP586H2123 、 LOC854342 、 DOK5 、 UBE2E2 、 USP53 、 VEPH1 、 SLC35E1 、 ANXA2 、 HLA-E 、

CD59、BHLHB2、UCHL1、SUSP3、CREDBL2、OCRL、OSGIN2、SLEC3B、IDS、TGFB2、TSPAN6、TM4SF1、MGLL、CD59、MAP4、CAST、LHFPL2、PLEKHM1、SAMD4A、VAMP1、ADD1、FAM129A、HPDC1、KLF11、DRAM、TREM140、BHLHB3、MGC17330、TBC1D2、KIAA1191、C5ORF32、C15ORF17、FAM791、CCDC104、PQLC3、EIF4E3、C7ORF41、DUSP18、SH3PX3、MYO5A、PRMT2、C8ORF61、SAMD9L、PGM2L1、HOM-TES-103、EPOR及TMEM112，或其中對選自包含以下之群之標記物為陽性之細胞的百分比係背景的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍：DGKA、TPBG、MGLL、EML1、MYO1B、LASS6、ROBO1、DKFZP586H2123、LOC854342、DOK5、UBE2E2、USP53、VEPH1、SLC35E1、ANXA2、HLA-E、CD59、BHLHB2、UCHL1、SUSP3、CREDBL2、OCRL、OSGIN2、SLEC3B、IDS、TGFB2、TSPAN6、TM4SF1、MGLL、CD59、MAP4、CAST、LHFPL2、PLEKHM1、SAMD4A、VAMP1、ADD1、FAM129A、HPDC1、KLF11、DRAM、TREM140、BHLHB3、MGC17330、TBC1D2、KIAA1191、C5ORF32、C15ORF17、FAM791、CCDC104、PQLC3、EIF4E3、C7ORF41、DUSP18、SH3PX3、MYO5A、PRMT2、C8ORF61、SAMD9L、PGM2L1、HOM-TES-103、EPOR及TMEM112。

在本發明之一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之選自包含以下之群之標記物的細胞：

HoxB3、HoxB7、MID1、SNAPC5、PPARG、ANXA2、TIPIN、MYLIP、LAX1、EGR1CRIP1、SULT1A3、STMN1、CCT8、SFRS10、CBX3、CBX1、FLJ11021、DDX46、ACADM、KIAA0101、TYMS、BCAS2、CEP57、TDG、MAP2K6、CSRP2、GLMN、HMGN2、HNRPR、EIF3S1、PAPOLA、SFRS10、TCF3、H3F3A、LOC730740、LYPLA1、UBE3A、SUM02、SHMT2、ACP1、FKBP3、ARL5A、GMNN、ENY2、FAM82B、RNF138、RPL26L1、CCDC59、PXMP2、POLR3B、TRMT5、ZNF639、MRPL47、GTPBP8、SUB1、SNHG1、ATPAF1、MRPS24、C16ORF63、FAM33A、EPSTL1、CTR9、GAS5、ZNF711、MTO1及CDP2，或其中對選自包含以下之群之標記物為陽性之細胞的百分比係背景的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍：

HoxB3、HoxB7、MID1、SNAPC5、PPARG、ANXA2、TIPIN、MYLIP、LAX1、EGR1、CRIP1、SULT1A3、STMN1、CCT8、SFRS10、CBX3、CBX1、FLJ11021、DDX46、ACADM、KIAA0101、TYMS、BCAS2、CEP57、TDG、MAP2K6、CSRP2、GLMN、HMGN2、HNRPR、EIF3S1、PAPOLA、SFRS10、TCF3、H3F3A、LOC730740、LYPLA1、UBE3A、SUM02、SHMT2、

ACP1、FKBP3、ARL5A、GMNN、ENY2、FAM82B、RNF138、RPL26L1、CCDC59、PXMP2、POLR3B、TRMT5、ZNF639、MRPL47、GTPBP8、SUB1、SNHG1、ATPAF1、MRPS24、C16ORF63、FAM33A、EPSTL1、CTR9、GAS5、ZNF711、MTO1及CDP2。

在本發明之一實施例中，間葉基質細胞製劑，其中該製劑包含實質上類似百分比之具有背景含量之選自包含以下之群之標記物的細胞：HoxB3、HoxB7、MID1、SNAPC5、PPARG、ANXA2、TIPIN、MYLIP、LAX1、EGR1、CRIP1、SULT1A3、STMN1、CCT8、SFRS10、CBX3、CBX1、FLJ11021、DDX46、ACADM、KIAA0101、TYMS、BCAS2、CEP57、TDG、MAP2K6、CSRP2、GLMN、HMGN2、HNRPR、EIF3S1、PAPOLA、SFRS10、TCF3、H3F3A、LOC730740、LYPLA1、UBE3A、SUM02、SHMT2、ACP1、FKBP3、ARL5A、GMNN、ENY2、FAM82B、RNF138、RPL26L1、CCDC59、PXMP2、POLR3B、TRMT5、ZNF639、MRPL47、GTPBP8、SUB1、SNHG1、ATPAF1、MRPS24、C16ORF63、FAM33A、EPSTL1、CTR9、GAS5、ZNF711、MTO1及CDP2，或其中具有選自包含以下之群之標記物之細胞的百分比係背景的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍：HoxB3、HoxB7、MID1、SNAPC5、PPARG、ANXA2、TIPIN、MYLIP、LAX1、EGR1、CRIP1、SULT1A3、STMN1、

CCT8、SFRS10、CBX3、CBX1、FLJ11021、DDX46、ACADM、KIAA0101、TYMS、BCAS2、CEP57、TDG、MAP2K6、CSRP2、GLMN、HMGN2、HNRPR、EIF3S1、PAPOLA、SFRS10、TCF3、H3F3A、LOC730740、LYPLA1、UBE3A、SUM02、SHMT2、ACP1、FKBP3、ARL5A、GMNN、ENY2、FAM82B、RNF138、RPL26L1、CCDC59、PXMP2、POLR3B、TRMT5、ZNF639、MRPL47、GTPBP8、SUB1、SNHG1、ATPAF1、MRPS24、C16ORF63、FAM33A、EPSTL1、CTR9、GAS5、ZNF711、MTO1及CDP2。

在另一實施例中，血管母細胞源MSC具有比成人源MSC更年幼之細胞之表型。在一個實施例中，MSC能夠在培養中經受至少5次、10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次或更多次群體倍增。成人源間葉基質細胞通常經受2至3次培養倍增。在另一實施例中，血管母細胞源MSC與成人源MSC相比具有更長端粒長度、更大免疫抑制效應、更少液泡，分裂更快，在培養中分裂更容易，具有更高CD90表現，涉及更少譜系，或其組合。在另一實施例中，血管母細胞源MSC與成人源MSC相比具有增加之促進細胞增殖之轉錄物之表現(即，具有更高增殖能力)及降低之參與終末細胞分化之轉錄物之表現。

在本發明之一實施例中，藉由本發明任一或多種方法產生間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞能夠在培養

中經受約5次、10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次或更多次群體倍增。

在本發明之另一實施例中，本發明之間葉基質細胞製劑能夠在培養中經受約5次、10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次或更多次群體倍增。在本發明之另一實施例中，本發明之間葉基質細胞製劑能夠在培養中經受約5次、10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次或更多次群體倍增，其中在該等群體倍增後，小於50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%或1%之間葉基質細胞已經受複製衰老。在再一實施例中，該製劑係醫藥製劑。

在本發明之另一實施例中，間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞已經受經受約5次、10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次或60次培養倍增，其中小於50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%或1%之該等間葉基質細胞已經受複製衰老，且其中該等間葉基質細胞保持幼年型表型及效能。先前實施例，其中該製劑係醫藥製劑。

在本發明之另一實施例中，間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞已經受約5次、10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次或60次培養倍增，其中小於50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%或1%之該等間葉基質細胞已經受複製衰老，其中該等間葉基質細胞保持幼年型表型及效能，且其中該製劑係醫藥製劑。

劑。先前實施例，其中該醫藥製劑包含有效數目之間葉基質細胞。

在本發明之另一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞已經受約5次、10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次或60次培養倍增，其中小於50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%或1%之該等間葉基質細胞已經受複製衰老，其中該等間葉基質細胞保持幼年型表型及效能，且其中該製劑係醫藥製劑。先前實施例，其中該醫藥製劑包含有效數目之間葉基質細胞，且其中保存該醫藥製劑。

在本發明之另一實施例中，間葉基質細胞製劑，其中該等間葉基質細胞已經受約5次、10次、15次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次或60次培養倍增。先前實施例，其中小於50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%、1%之該等間葉基質細胞已經受複製衰老，其中該等間葉基質細胞保持幼年型表型及效能，其中該製劑係醫藥製劑，其中該醫藥製劑包含有效數目之間葉基質細胞，且其中保存該醫藥製劑。

在另一實施例中，本發明提供包含間葉基質細胞之醫藥製劑之套組。在另一實施例中，本發明提供包含間葉基質細胞之醫藥製劑之套組，其中保存該製劑。在另一實施例中，本發明提供包含藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑之套組。在另一實施例中，本發明提供包

含藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑之套組，其中保存該製劑。

在另一實施例中，本發明提供藉由向有需要之個體投與有效量之間葉基質細胞源自血管母細胞治療病狀之方法。該病狀可包括(但不限於)自體免疫病症、葡萄膜炎、骨質流失或軟骨損傷。

藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞與直接源自ESC之MSC相比具有經改良特性。例如，ESC源MSC與血管母細胞源MSC相比凝塊更多，在分裂時更難以分散，在以等數目之ESC開始時幾乎不產生一樣多之MSC，且獲得特徵性MSC細胞表面標記物耗時更久。參見實例2及圖3至6。

在本發明之一個實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑可有效地使病狀正常化。在本發明之再一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑可有效地降低過度或不期望之免疫反應。在本發明之再一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑，其中該製劑可有效地改善自體免疫病症。在本發明之再一實施例中，藉由向宿主投與有效量之藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞使病狀正常化。在本發明之再一實施例中，其中病狀正常化之特徵在於選自包含以下之群之效應：由該等MSC釋放細胞介素、刺激調節性T細胞之數目之增加、抑制自Th1細胞釋放某一量之IFN γ 及刺激自Th2細胞分泌某一量之IL4。在

本發明之再一實施例中，投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑導致自該等間葉基質細胞釋放選自包含以下之群之細胞介素：轉化生長因子 β 、吲哚胺2,3二氧酶、前列腺素E2、肝細胞生長因子、一氧化氮、介白素10、介白素6、巨噬細胞群落刺激因子及可溶性人類白血球抗原(HLA) G5。

在本發明之再一實施例中，投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞製劑導致自該等間葉基質細胞釋放選自包含以下之群之細胞介素：轉化生長因子 β 、吲哚胺2,3二氧酶、前列腺素E2、肝細胞生長因子、一氧化氮、介白素10、介白素6、巨噬細胞-群落刺激因子、可溶性人類白血球抗原(HLA) G5、介白素4、8、11、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子、血管內皮生長因子、類胰島素生長因子1、磷脂酰肌醇-聚糖生物合成F類蛋白、單核球化學吸引蛋白1、基質源因子1、腫瘤壞死因子1、轉化生長因子 β 、鹼性纖維母細胞生長因子、血管生成素1及2、由干擾素 γ 誘導之單核因子、干擾素誘導型蛋白10、腦源性神經營養因子、介白素1受體 α 、趨化因子配體1及2。

MSC醫藥製劑

本發明MSC可與醫藥上可接受之載劑調配。例如，本發明MSC可單獨或作為醫藥調配物之組份投與，其中該等MSC可經調配用於以任何便利方式投與用於醫學。在本發明實施例之一個實施例中，其中間葉基質細胞之醫藥製劑包含該等間葉基質細胞組合一或多種選自由以下組成之群

之醫藥上可接受之無菌等滲水溶液或非水溶液：分散液、懸浮液、乳液、視情況在即將利用前重構成無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末、抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、溶質或懸浮劑及增稠劑。

在本發明之一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受介於約5次與約100次間之群體倍增。在本發明之再一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受介於約10次與約80次間之群體倍增。在本發明之再一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受介於約25次與約60次間之群體倍增。在本發明之再一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受小於約10次群體倍增。在本發明之再一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受小於約20次群體倍增。在本發明之再一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受小於約30次群體倍增，其中該等間葉基質細胞未經受複製衰老。在本發明之再一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受小於約30次群體倍增，其中小於約25%之該等間葉基質細胞已經受複製衰老。在本發明之再一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受小於約30次群體倍增，其中小於約10%之該等間葉基質細胞已經受複製衰老。在本發明之再一實施例中，間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該等間葉基質細胞已經受小於

約30次群體倍增，其中小於約10%之該等間葉基質細胞已經受複製衰老，且其中該等間葉基質細胞表現選自包含以下之群之標記物：AIRE-1、IL-11、CD10、CD24、ANG-1及CXCL1。

MSC之醫藥製劑之注射濃度可為有效且(例如)實質上不含ESC之任何量。例如，醫藥製劑可包含本文所述MSC之數目及類型。在特定實施例中，MSC之醫藥製劑包含約 1×10^6 個該等藉由培養血管母細胞獲得之MSC用於全身性投與有需要之宿主，或約 1×10^4 個該等藉由培養血管母細胞獲得之MSC用於局部投與有需要之宿主。

可利用自培養血管母細胞獲取之MSC治療之疾病及病況已顯示，MSC可治療多種疾病及病況。特定而言，MSC遷移至損傷部位，施加免疫抑制效應，且促進受損組織修復。本發明之一實施例，其中間葉基質細胞之醫藥製劑減少病狀之表現。本發明之一實施例，其中向罹患病狀之宿主投與間葉基質細胞之醫藥製劑。在本發明之再一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑減少選自包含以下之群之病狀之表現：傷口癒合、移植物抗宿主疾病(GvHD)、疾病、慢性眼病、視網膜變性、青光眼、葡萄膜炎、急性心肌梗塞、慢性疼痛、肝炎、腎炎。在本發明之又一實施例中，藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑減少馬類蹄葉炎之表現。進一步例如，MSC可與同種異體移植細胞或組織(例如，包含已自ES細胞分化之細胞之製劑，該等已自ES細胞分化之

細胞係(例如)視網膜色素上皮(RPE)細胞、少突細胞前體、視網膜細胞、角膜細胞、肌(例如骨骼肌、平滑肌或心肌)細胞或其任一組合、或其他)組合投與，藉此降低針對移植細胞或組織之免疫反應之可能性且潛在地避免對其他免疫抑制之需要。藉由培養本文所述血管母細胞獲得之間葉基質細胞可用於類似應用中。本發明方法之一實施例，其中向宿主投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑減少對將來療法之需要。本發明方法之一實施例，其中向宿主投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑減少對將來療法之需要，其中該療法抑制免疫功能。

在本發明之一實施例中，向宿主投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑用於治療病狀。在本發明之一實施例中，向宿主投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑用於治療選自包含以下之群之列表之病狀：多發性硬化、全身性硬化、血液惡性腫瘤、心肌梗塞、組織及器官移植、組織及器官排斥、慢性同種異體移植腎病、硬化、肝衰竭、心臟衰竭、GvHD、脛骨骨折、左心室功能障礙、白血病、骨髓發育不良症候群、克隆氏病、類型I或類型II糖尿病、慢性阻塞性肺病、肺高壓、慢性疼痛、骨發生不全、純合性家族性低膽固醇血症、半月板切除後治療、成人牙周炎、嚴重心肌缺血患者之血管發生、脊髓損傷、骨發育不良、與糖尿病相關之急性肢體缺血、糖尿病性足病、原發性薛格連氏症候群、

骨關節炎、軟骨缺損(例如，關節軟骨缺損)、多系統萎縮、肌萎縮性脊髓側索硬化、心臟手術、頑固性全身性紅斑性狼瘡、活腎同種異體移植、非惡性紅血球病症、熱灼傷、帕金森氏病、微骨折(例如，在膝關節軟骨缺損損傷患者中)、大皰性表皮鬆懈、嚴重冠狀動脈缺血、特發性擴張性心肌病變、股骨頭骨壞死、狼瘡腎炎、骨間隙缺損、缺血性腦中風、中風後、急性輻射症候群、肺病、關節炎及骨再生。

在本發明之再一實施例中，向宿主投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑用於治療選自包含以下之列表之自體免疫病狀：急性壞死性出血性腦白質炎、阿狄森氏病(Addison's disease)、無 γ 球蛋白血症、斑禿、類澱粉變性、關節黏連性脊椎炎、抗-GBM/抗-TBM腎炎、抗磷脂症候群(APS)、自體免疫血管性水腫、自體免疫再生不良性貧血、自體免疫自主神經機能障礙、自體免疫肝炎、自體免疫血內脂質過多、自體免疫免疫缺陷、自體免疫內耳疾病(AIED)、自體免疫心肌炎、自體免疫胰腺炎、自體免疫視網膜病變、自體免疫血小板減少性紫癜(ATP)、自體免疫甲狀腺疾病、自體免疫蕁麻疹、軸突及神經元神經病變、巴婁病(Balo disease)、貝賽特氏病(Behcet's disease)、大水皰性類天皰瘡病、心肌病、卡斯特雷曼(Castleman disease)、腹瀉疾病、查加斯氏病(Chagas disease)、慢性疲勞症候群、慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病變(CIDP)、慢性復發性多病灶骨髓炎

(CRMO)、丘-施氏症候群(Churg-Strauss syndrome)、癰疽性類天皰瘡/良性黏膜性類天皰瘡病、克隆氏病、柯剛氏症候群(Cogans syndrome)、冷凝集素疾病、先天性心臟傳導阻滯、柯薩奇心肌炎(Coxsackie myocarditis)、CREST疾病、特發性混合性冷球蛋白血症、脫髓鞘神經病變、皰疹樣皮炎、皮炎、德維克氏病(Devic's disease)(視神經脊髓炎)、盤狀狼瘡、德雷斯勒氏症候群(Dressler's syndrome)、子宮內膜異位症、嗜酸性球性食道炎、嗜酸性球性筋膜炎、結節性紅斑、實驗性過敏性腦脊髓炎、伊文思症候群(Evans syndrome)、纖維肌痛、纖維化肺泡炎、巨細胞動脈炎(顳動脈炎)、腎小球腎炎、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、伴隨多血管炎之肉芽腫病(Granulomatosis with Polyangiitis)(GPA)(參見韋格納氏病(Wegener's))、格雷夫氏病(Graves' disease)、格-巴症候群(Guillain-Barre syndrome)、橋本氏腦炎(Hashimoto's encephalitis)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、溶血性貧血、亨諾-許蘭氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、妊娠皰疹、低 γ 球蛋白血症、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、IgA腎病、IgG4相關性硬化性疾病、免疫調節性脂蛋白病、包涵體肌炎、胰島素依賴性糖尿病(1型)、間質性膀胱炎、青少年關節炎、青少年糖尿病、川崎症候群(Kawasaki syndrome)、朗-伊症候群(Lambert-Eaton syndrome)、白細胞分裂性血管炎、扁平苔蘚、硬化性苔蘚、木樣結膜炎、線狀IgA疾病(LAD)、狼瘡(SLE)、萊姆

病(Lyme disease)、慢性梅尼爾氏病(Meniere's disease)、顯微鏡下多血管炎、混合性結締組織病(MCTD)、莫倫氏潰瘍(Mooren's ulcer)、穆-哈病(Mucha-Habermann disease)、多發性硬化、重症肌無力、肌炎、發作性睡病、視神經脊髓炎(德維克氏病)、嗜中性白血球減少、眼部癍痕性類天皰瘡病、視神經炎、復發性風濕病、PANDAS(與鏈球菌相關之小兒自體免疫神經精神病症)、副腫瘤性小腦變性、陣發性夜間血紅素尿症(PNH)、帕羅症候群(Parry Romberg syndrome)、帕-特症候群(Parsonnage-Turner syndrome)、睫狀體扁平部炎(周邊葡萄膜炎)、天皰瘡、周邊神經病變、靜脈周邊性腦脊髓炎、惡性貧血、POEMS症候群、結節性多發性動脈炎、I型、II型及III型自體免疫多腺症候群、風濕性多肌痛、多肌性、心肌梗塞後症候群、心包切開術後症候群、黃體酮性皮炎、原發性膽汁性硬化、原發性硬化性膽管炎、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、特發性肺纖維化、壞疽性膿皮病、純紅血球再生不良、雷諾現象(Raynauds phenomenon)、反射性交感神經失養症、賴特氏症候群(Reiter's syndrome)、復發性多軟骨炎、不寧腿症候群、腹膜後纖維化、風濕熱、類風濕性關節炎、類肉瘤病、施密特症候群(Schmidt syndrome)、鞏膜炎、硬皮病、薛格連氏症候群、精子及睪丸自體免疫性、僵直人症候群(Stiff person syndrome)、亞急性細菌性心內膜炎(SBE)、蘇薩克氏症候群(Susac's syndrome)、交感性眼炎、高安動脈炎(Takayasu's

arteritis)、顱動脈炎/巨細胞動脈炎、血小板減少性紫癜(TTP)、妥洛沙-韓特症候群(Tolosa-Hunt syndrome)、橫貫性脊髓炎、潰瘍性結腸炎、未分化結締組織病(UCTD)、葡萄膜炎、血管炎、囊泡形皮膚炎、白斑病及韋格納氏內芽腫病(現在稱為伴隨多血管炎之肉芽腫病(GPA))。

利用自培養血管母細胞獲取之MSC之治療方案

本文所述MSC及包含本文所述MSC之醫藥製劑可用於基於細胞之治療。特定而言，本發明提供治療或預防本文所述疾病及病況之方法，其包含投與有效量之包含MSC之醫藥製劑，其中該等MSC係自培養血管母細胞獲取。

本發明MSC可利用業內已知模式投與，包括(但不限於)經由靜脈內、心肌內、經心內膜、玻璃體內或肌內途徑注射或局部植入，此端視所治療特定病狀而定。

本發明間葉基質細胞可經由局部植入投與，其中利用遞送裝置。本發明遞送裝置係生物相容且生物可降解的。本發明遞送裝置可使用選自包含以下之群之物質製造：生物相容纖維、生物相容紗、生物相容發泡體、脂肪族聚酯、聚(胺基酸)、共聚(醚-酯)、聚草酸伸烷基酯、聚醯胺、酪胺酸衍生之聚碳酸酯、聚(亞胺基碳酸酯)、聚原酸酯、聚氧雜酯(polyoxaesters)、聚醯胺基酯、含有胺基之聚氧雜酯、聚(酸酐)、聚膦腈、生物聚合物；丙交酯、乙交酯、 ϵ -己交酯、對二氧雜環己酮、碳酸三亞甲基酯之均聚物及共聚物；丙交酯、乙交酯、 ϵ -己交酯、對二氧雜環己酮、

碳酸三亞甲基酯之均聚物及共聚物、纖維狀膠原、非纖維狀膠原、未經胃蛋白酶處理之膠原、與其他聚合物組合之膠原、生長因子、細胞外基質蛋白、生物學相關肽片段、肝細胞生長因子、血小板源生長因子、富血小板血漿、胰島素生長因子、生長分化因子、血管內皮細胞源生長因子、菸鹼醯胺、類升糖素肽、腱糖蛋白(tenascin)-C、層黏連蛋白、抗排斥劑、鎮痛劑、抗氧化劑、抗細胞凋亡劑、抗炎劑及細胞抑制劑。

特定治療方案、投與途徑及佐劑療法可基於特定病理、病理之嚴重程度及患者之總體健康狀況進行調適。投與包含MSCs之醫藥製劑可有效降低病理表現之嚴重程度或及/或預防病理表現之進一步退化。

本發明治療模式可包含投與單劑量MSCs。或者，本文所述治療模式可包含在一段時間內多次投與MSCs之療程。實例性療程可包含每週一次、每兩週一次、每月一次、每季一次、每半年一次或每年一次治療。或者，可分階段進行治療，其中最初需要多劑量(例如第一週為每日劑量)，且隨後需要較少且頻率較低之劑量。

在一個實施例中，在患者一生中，將藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑週期性地投與患者一或多次。在本發明之再一實施例中，每年一次、每6至12個月一次、每3至6個月次、每1至3個月一次或每1至4週一次向宿主投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑。或者，對於某些病況或病症而言，更頻繁地投與

可能合意。在本發明之一實施例中，在患者一生中，經由裝置週期性地投與藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑一次、超過一次，或針對所治療特定患者及患者之病狀視需要投與。類似地，涵蓋隨時間而變化之治療方案。例如，在開始時可能需要更頻繁治療(例如，每日一次或每週一次治療)。當患者之病況隨時間而有所改良時，可能需要較低頻率治療或甚至不需要進一步治療。

本文所述方法可進一步包含利用業內已知方法監測治療或預防功效之步驟。

套組

本發明提供包含本文所述任一組合物之套組。間葉基質細胞製劑可含於根據熟習此項技術者已知之方法製造之遞送裝置中，且包括美國專利申請公開案2002/0103542、歐洲專利申請案EP 1 454 641中之方法，或根據熟習此項技術者已知之方法保存，且包括美國專利8,198,085、PCT申請案WO 2004/098285及美國專利申請公開案2012/0077181中之方法。在本發明之一實施例中，套組包含約至少 8×10^7 個、 8.5×10^7 個、 9×10^7 個、 9.5×10^7 個、 1×10^8 個、 1.25×10^8 個或 1.25×10^8 個自培養血管母細胞獲取之MSC之製劑。在另一實施例中，套組包含約 8×10^7 個、 8.5×10^7 個、 9×10^7 個、 9.5×10^7 個、 1×10^8 個、 1.25×10^8 個或 1.25×10^8 個藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之製劑，其中該製劑係醫藥製劑。在本發明之又一實施例中，套組包含約 8×10^7 個、 8.5×10^7 個、 9×10^7 個、 9.5×10^7 個、

1×10^8 個、 1.25×10^8 個或 1.25×10^8 個藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑，其中保存該醫藥製劑。在本發明之又一實施例中，套組包含約 8×10^7 個、 8.5×10^7 個、 9×10^7 個、 9.5×10^7 個、 1×10^8 個、 1.25×10^8 個或 1.25×10^8 個藉由培養血管母細胞獲得之間葉基質細胞之醫藥製劑，其中該醫藥製劑含於細胞遞送媒劑中。

另外，套組可包含極冷保藏之 MSC 或極冷保藏之 MSC 之製劑、冷凍 MSC 或冷凍 MSC 之製劑、經解凍冷凍 MSC 或經解凍冷凍 MSC 之製劑。

各種實施例及概念之組合

應理解，本文所述實施例及概念可組合利用。例如，本發明提供產生 MSC 之方法，其包含自 ESC 產生血管母細胞，將血管母細胞培養至少 6 天，收穫血管母細胞，將血管母細胞再平鋪於基質膠塗佈板上，及將本文所述血管母細胞培養至少 14 天，其中該方法產生至少 85,000,000 個實質上不含 ESC 之 MSC。

實例

以下實例不意欲以任何方式限制本發明。

實例 1-自血管母細胞產生 MSC

如下自臨床級單分裂球源 ESC 系 MA09 產生血管母細胞 [16]：

首先，自在補充有成形素及早期造血細胞介素之組合之無血清培養基中培養的 MA09 ESC 產生早期細胞簇，該等早期造血細胞介素具體而言為骨形態演發蛋白-4(BMP-

4)、血管內皮生長因子(VEGF)、幹細胞因子(SCF)、血小板生成素(Tpo)及fms相關酪胺酸激酶3配體(FL)。更具體而言，將來自6孔組織培養物處理板之一孔之ESC平鋪於6孔超低附著板(Corning)之一孔中補充有50 ng/ml VEGF及50 ng/ml BMP-4 (R & D)之3 ml Stemline II培養基(Sigma)中，且在37℃及5% CO₂下培育。在前24 hr內形成細胞簇。在40小時至48小時後，用補充有50 ng/ml VEGF、50 ng/ml BMP-4及40-45 ng/ml bFGF之新鮮Stemline II培養基替換一半培養基(1.5 ml)，且再持續培育40小時至48小時(即，總共3.5天至4天)。

將細胞簇解離且以單細胞平鋪於無血清半固體母細胞群落生長培養基(BGM)中。具體而言，藉由0.05%胰蛋白酶-0.53 mM EDTA(Invitrogen)將細胞簇解離2 min至5 min。上下吸取細胞懸浮液且隨後添加DMEM+10% FCS以使胰蛋白酶不活化。然後使細胞經過40 μm濾網以獲得單細胞懸浮液。然後將細胞計數且以1-1.5×10⁶個細胞/ml再懸浮於Stemline II培養基中。

將單細胞懸浮液(0.3 ml，3至4.5×10⁵個細胞)與2.7 ml血管母細胞生長培養基(如上文所述基於H4536之培養基配方)混合，同時進行簡單渦旋，且靜置5 min。隨後藉由利用附接有18G針之注射器(3 ml)將細胞混合物轉移至6孔超低附著板之一孔，且在37℃及5% CO₂下培育。

一些細胞發育成葡萄樣母細胞群落(BC)。具體而言，3天時可見BC(在第3天開始時通常含有小於10個細胞)，且

在4天至6天後，在顯微鏡下容易鑑別葡萄樣hES-BC(每BC含有大於100個細胞)。存於培養物中之BC之數目在若干天進程內逐漸增加。在6天至7天後，可利用口形玻璃毛細管(mouth-glass capillary)拾取BC。

可在培養7天與12天之間收穫血管母細胞且將其再平鋪至基質膠塗佈組織培養板上之 α MEM+20% FCS中。流式細胞術分析顯示，在開始血管母細胞群體中，通常在MSC上發現之5種細胞表面標記物之表現量相對較低。(圖2，左圖，4次實驗之平均值 $\pm$ 標準偏差)。然而，在MSC生長條件下培養三週後，產生對該5種特徵性MSC標記物染色 $>90\%$ 陽性之均勻附著細胞群體(圖2，右圖-22天至23天，4次實驗之平均值 $\pm$ 標準偏差)。在MSC培養條件後，使細胞分化以獲得MSC表面標記物所需時間量可端視所用具體ESC系、血管母細胞收穫天數及平鋪至基質膠上之血管母細胞之數目而變化。在一些實驗中，7天至14天時，90%細胞中產生標記物，而在其他實驗中，此許多細胞獲得該等MSC標記物可能需22天至24天。

實例2-ESC源血管母細胞與MSC源血管母細胞之分化之比較

此實例闡述藉由兩種方法使ESC分化成MSC之比較：直接分化(其中將ESC直接平鋪於明膠或基質膠上)或血管母細胞法(其中首先使ESC分化成血管母細胞且隨後平鋪於基質膠上，如實例1中所述)。在明膠上直接分化產生MSC樣細胞，但該等細胞缺乏CD105表現，從而表明不完全採用

MSC情形(圖3, 左圖)。當將ESC直接平鋪於基質膠上時, 所得細胞表現CD105, 如針對MSC所預計(圖3, 中圖)。然而, 與藉由血管母細胞法產生之MSC相比, 直接分化之MSC細胞呈塊狀生長, 在分裂時更難以分散, 且在自等數目之ESC開始時幾乎不產生一樣多之MSC(圖4)。

直接自ESC分化之MSC亦需較長時間來獲得特徵性MSC細胞表面標記物(圖5)。在獲得MSC後, 擴展免疫分型顯示, 來自兩種方法之MSC皆對通常在MSC上發現之其他標記物(例如HLA-ABC)為陽性, 而對造血作用相關標記物(例如CD34及CD45)為陰性(圖6)。該等結果表明, 利用中間期血管母細胞允許自ESC穩健產生同源MSC。考慮到該等發現, 將利用血管母細胞源MSC實施對MSC之其他研究, 而不對自直接ESC-分化方法產生之MSC進行該等研究。

實例3-源自血管母細胞之MSC分化成其他細胞類型

MSC按照定義應能產生脂肪細胞、骨細胞及軟骨細胞。利用標準方法, 圖7顯示血管母細胞源MSC分化成脂肪細胞及骨細胞之能力, 而圖8經由軟骨細胞特異性基因之表現顯示其向軟骨細胞分化之潛力。

預計源自血管母細胞之MSC分化成脂肪細胞、骨細胞及軟骨細胞。該等分化途徑可利用先前在先前技術中所報導之方法來檢查。參見Karlsson等人Stem Cell Research 3: 39-50 (2009)(關於血管母細胞源MSC及直接ESC源MSC至脂肪細胞及骨細胞之分化(圖7))。對於軟骨細胞分化而

言，已自Gong等人J. Cell. Physiol. 224: 664-671 (2010)修改方法來研究此過程，並繼續經由番紅O(Safranin O)、阿爾新藍(alcian blue)及/或甲苯藍染色來檢查軟骨細胞特異性基因(例如，聚集蛋白聚糖及膠原IIa，如圖8中所示)之獲得以及糖胺聚糖沈積。文獻中已報導，源自MSC之該三種細胞類型(脂肪細胞、骨細胞或軟骨細胞)皆不會表現免疫刺激HLA DR分子(Le Blanc 2003, Gotherstrom 2004, Liu 2006)。將對該等完全分化MSC細胞類型實施免疫染色及/或流式細胞術以確認該等所報導觀察。此對於確認以下情形至關重要：MSC在活體內環境中之分化將不誘導來自宿主接受者之免疫反應。在該三種細胞類型中，軟骨形成性分化可因其用於針對運動損傷、衰老性關節疼痛、骨關節炎等之軟骨替代療法中之潛力而尤其引人關注。對於此等療法而言，MSC可無需完全分化成軟骨細胞，以在治療上利用。

實例4-確認源自血管母細胞之MSC實質上不含ESC

MSC亦應沒有形成畸形胎之ESC傾向。藉由傳代12次(培養約50天)來確認MSC含有正常核型(數據未顯示)。為確認母細胞源MSC不含有痕量ESC，在NOD/SCID小鼠中實施畸形胎形成分析。經皮下將 5×10^6 個MSC注射至3隻小鼠之左大腿肌中。利用CT2 EC作為陽性對照，且將在6週時程內監測小鼠，以比較MSC對ESCC注射小鼠中之畸形胎形成。在經MSC注射小鼠中未形成畸胎瘤。

實例5-藉由源自血管母細胞之MSC降低EAE評分

實施利用血管母細胞源ESC-MSC治療6週至8週C57BL/6小鼠之實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)的先導研究。藉由在第0天經皮下將50 pg MOG (35-55)肽及250 pg結核分枝桿菌(*M. tuberculosis*)存於佐劑油(CFA)中之100 pL乳液注射至小鼠兩側中來誘導EAE，亦經腹膜內用500 ng百日咳毒素注射小鼠。6天後，經腹膜內用1,000,000個存於PBS中之ESC-MSC(n=3)或媒劑作為對照(n=4)注射小鼠。記錄動物在免疫後29天之臨床評分。觀察到疾病評分顯著降低(數據未顯示)。

實例6-確認血管母細胞源ESC-MSC在EAE治療及其他動物疾病模型之應用中之功效

A. 根據小鼠EAE模型測試ESC-MSC，確認其抗-EAE效應。

為確認實例5中獲得之結果，利用增加之動物數目、不同細胞劑量、不同投與方案及較多對照實施其他測試。記錄臨床評分及死亡率。亦將評價小鼠之腦及脊髓中之淋巴球浸潤程度。通常認為MSC抗-EAE效應涉及免疫抑制活性，例如抑制Th17細胞，且預計其會降低在CNS中之淋巴球浸潤程度。

B. 比較ESC-MSC與小鼠骨髓(BM)-MSC、人類BM-MSC及人類UCB-MSC。

小鼠BM-MSC首先用於EAE治療且已經充分研究[1]。可直接比較ESC-MSC (假定其異種性質)與鼠類BM-MSC之抗-EAE功效。已顯示，人類UCB-MSC亦具有免疫抑制活

性[19]。亦可在EAE小鼠模型中比較人類UCB-MSc及人類BM-MSc之抗-EAE活性與ESC-MSc之抗-EAE活性。該等不同細胞類型之年齡或傳代次數可影響其抗-EAE性質，因此亦將在EAE小鼠模型系統中評估年齡對MSc之功效之影響。

C. 將ESC-MSc之投與劑量、途徑及計時最佳化。

注射ESC-MSc可降低EAE評分，如在免疫後29天內所記錄。為研究疾病之長期預防及治癒，可以不同劑量、途徑及時間投與ESC-MSc。

已自H1gfp ESC產生MSc，且確認其在MSc狀態下仍表現GFP。可用該等GFP+ESC-MSc注射EAE小鼠，且可藉由利用Xenogen活體內成像系統在活體內追蹤其分佈。經由該等方法，將分析ESC-MSc之不同投與劑量、途徑及計時，並提供關於以下之資訊：MSc抗-EAE活性(即，旁分泌或內分泌效應)之作用機制、MSc在小鼠內之壽命以及MSc生物分佈及消除/清除途徑。

抗-EAE效應可反映為降低之臨床評分、延長之存活及/或CNS之經衰減淋巴球浸潤及脫髓鞘中之一或多者。不同ESC系產生MSc之固有能力的不同。因此，可在此研究中利用多個ESC系，且可隨時間監測MSc標記物之獲得，並比較各ESC系。為利用ESC-MSc進一步降低實驗間之變異，可將大批冷凍ESC-MSc原料製成等分試樣，且各等分試樣原料可用於多個實驗中。

D. 確認血管母細胞源MSc在其他疾病模型中之功效。

如上文所提及，MSC亦可具有針對其他自體免疫病症類型(例如克隆氏病、潰瘍性結腸炎及眼部病症、葡萄膜炎)之治療活性。存在該等疾病之動物模型且其為業內所熟知(例如，參見Pizarro等人2003；Duijvestein等人2011；Liang等人2011；Copland.等人2008)。可擴展活體內研究以包括對MSC在該等動物模型系統中之一或多者中之治療效用之評價。此等模型可使得可藉由針對人類細胞介素分離並篩選經注射動物之血清來檢查人類MSC之細胞介素分泌譜。特定而言，可用作局部玻璃體內注射之葡萄膜炎模型可允許吾等研究MSC在非全身性環境中之效應。

MSC亦可在治療骨關節炎病況(包括彼等涉及關節軟骨損失及受影響關節發炎者)中具有巨大的治療效用(Noth等人，2008)。檢查骨關節炎、軟骨損失及關節發炎之模型為業內所熟知(例如，參見Mobasheri等人2009)。在該等研究中之一些中，將人類BM-MSC囊封於半固體支架或微球體中且移植至人類個體之受影響關節中，以確定MSC是否在降低發炎及/或恢復軟骨方面具有局部非全身性治療效應(Wakitani等人2002)。此等方法將有助於確定吾人ESC血管母細胞源MSC用於治療變性關節病況之治療效用。

所注射MSC之壽命極短[8]，此指示，無需移植細胞之長期存活。因此，亦可測試有絲分裂不活化之ESC-MSC(例如，利用絲裂黴素C輻照或處理)在上述動物模型中之抗-EAE效應或其他抗疾病效應。若如此，則可能無需活ESC-MSC，由此進一步降低來自移植ESC-MSC中潛在殘

餘ESC污染之生物安全擔憂。

E. 結果

預計來自不同供體源來源之MSC(小鼠BM-MSC、人類BM-MSC及人類UCB-MSC)具有抗-EAE效應。然而，其效應可在實驗之間有所變化，此乃因MSC係來自供體受限來源。相比之下，本發明ESC-MSC可具有更一致效應。由於使用許多細胞表面標記物來表徵MSC，且並非每一MSC皆表現所有標記物，因此可使用標記物子集(例如，CD73+及CD45-)來比較來自不同來源之MSC之功效。

預計ESC-MSC在克隆氏病、潰瘍性結腸炎及葡萄膜炎之動物模型中具有治療效用，此乃因該等ESC-MSC含有自體免疫組份及發炎性反應。

經輻照ESC-MSC可至少部分地保持免疫抑制功能，此乃因其仍分泌細胞介素並表現與該功能有關之細胞表面標記物[29]。然而，其效應可因其縮短之活體內壽命而降低。若如此，則可增加經輻照細胞之劑量及投與頻率以增強免疫抑制功能。經輻照ESC-MSC可至少部分地保持免疫抑制功能，此乃因其仍分泌細胞介素並表現與該功能有關之細胞表面標記物[29]。然而，其效應可因其縮短之活體內壽命而降低。若如此，則可增加經輻照細胞之劑量及投與頻率以增強免疫抑制功能。

實施治療EAE之第二先導研究。經由皮下注射用存於完全弗氏佐劑(complete freund's adjuvant)中之MOG35-55肽對8週至10週齡C57BL/6小鼠實施免疫。此係結合腹膜內注

射百日咳毒素進行。6天後，每隻小鼠經腹膜內注射1,000,000個活(或2,000,000個經輻照)血管母細胞源多能細胞-間葉基質細胞。藉由監測小鼠肢體/機體移動，按照0至5之標度對疾病嚴重程度評分，如先前所公開。結果顯示，利用傳代4次之血管母細胞源多能細胞-間葉基質細胞及經輻照血管母細胞源多能細胞-間葉基質細胞與媒劑對照相比，臨床評分顯著降低(數據未顯示)。根據以下方案對兩種先導研究評分：評分為1指示無力尾部(limp tail)，2指示後腿部分麻痺，3係後腿完全麻痺，4係後腿完全且前腿部分麻痺，5係垂死狀態。

實例7-對ESC-MSC之功能組份之研究

MSC可定義為當在未經誘導狀態中培養(例如，在不具有細胞介素之規則 α MEM+20% FCS中培養)時表現以下細胞表面標記物而同時對CD34、CD45、CD14、CD19、CD11b、CD79a及CD31為陰性之塑膠附著細胞：CD105、CD73、CD29、CD90、CD166、CD44、CD13及HLA-I類(ABC)。在該等條件下，其必須表現細胞內HLA-G且對CD40及HLA II類(DR)為陰性。在功能上，此等細胞亦必須能夠分化成脂肪細胞、骨細胞及軟骨細胞，如藉由標準活體外培養物分析所評價。在用干擾素 γ (IFN γ)刺激7天後，MSC應表現HLA-G(在其細胞表面上)以及CD40及HLA-II類(DR)(在其細胞表面上)。儘管有該等要求，但源自任何來源之MSC仍可含有一些異質性，且由於ESC之多能性，因此源自ESC之MSC培養物可含有來自三種胚層之

任何譜系之細胞。儘管本文所述培養系統指示，>90%之細胞常規地展示上述免疫表型及功能特性，但在MSC培養物中可存在缺乏一或多種MSC細胞表面標記物表現或表現一或多種應不存在之標記物的少量細胞亞群。將檢查此等亞群在吾人MSC培養物中之程度以確定污染異質性程度。可在BD LSR II流式細胞儀上實施多色流式細胞術(同時8種以上色彩)，以測定上述標記物間之重疊。此亦可幫助明確最大免疫抑制活性所需之實際細胞表面標記物譜。

A. 表徵ESC-MSC與其免疫抑制效應相關之分化階段、亞群及活化狀態。

存在大時間窗口(例如，在MSC分化培養基中至少第14天至第28天)，以收穫ESC-MSC(例如，參見圖1)。若干研究已指示，MSC在長培養期期間，隨著其連續傳代及變老，往往損失其免疫抑制功能且可衰老。因此，可在不同時間點收穫細胞，以確定活性，在MSC培養基中之特定天數提供較大免疫抑制活性。事實上，於早期時間點(例如，在MSC培養條件下14天)採集之MSC可含有尚未完全獲得全部特徵性MSC細胞表面標記物，但具有高效免疫抑制效應之前體細胞。為界定潛在有用之MSC前體群體，自第7天至第28天，在整個MSC分化過程中追蹤寬範圍之細胞表面標記物之表現。已觀察到，至少50%培養物將在14天MSC培養條件內獲得細胞表面標記物CD309(其他名稱包括VEGFR2、KDR)。開始血管母細胞群體(圖9，第一時間點，在d7及8收穫之MA09血管母細胞)在很大程度上缺乏

CD309，但在前兩週MSC培養條件內上升且隨後在第28天再次下降返回至小於5%細胞(圖9，第二、第三及第四時間點)。已發現，此模式不僅發生於MA09血管母細胞源MSC，且亦發生於彼等來自MA01、H1gfp及H7 ESC者。在該等實驗中，血管母細胞常規地對CD309為陰性(小於5%細胞染色為陽性)，而不管其收穫日期(第6至14天)。然而，當自較年老血管母細胞(例如，d10或d12母細胞)產生MSC時，可降低獲得CD309表現之所產生MSC之百分比。以類似方式，已觀察到，血管母細胞源MSC之擴增性質可端視血管母細胞之收穫日期而有所不同。自較年幼血管母細胞(第6天或第7天)產生之MSC不繼續如自較年老(d8-12)血管母細胞產生之MSC一樣穩健地擴增。收穫血管母細胞之最佳日期可為中間日期(第8至10天)，此乃因其可允許充分獲得CD309作為MSC產生之替代標記物，同時仍維持在第28天及更長時間內穩健擴增之能力。吾人正在進行將MSC前體產生之該等態樣最佳化之工作。

除已證明為MSC之最典型標記物之CD105、CD90及CD73(如由International Society for Cellular Therapy所指出作為最低MSC分類(Dominici等人，Cytotherapy 8 (4): 315-317 (2006))外，亦已提出或使用許多上文未提及之其他細胞表面分子(例如CD49a、CD54、CD80、CD86、CD271、VCAM及ICAM)作為MSC標記物[22]。因此，可能地，ESC-MSC在自HB分化期間可含有表現其他標記物之不同組合之亞群，此可具有不同免疫抑制活性。亞群可基

於一或多種分析用標記物(個別地或以組合方式)進行分選(例如，利用FACS)，以利用活體外或活體內方法比較其免疫抑制活性。

B. 將分化及擴增條件最佳化以獲得大量功能性ESC-
MSC。

儘管初步實驗已指示，MSC可維持在IMDM+10%熱不活化人類血清中，但吾人尚未測試其在此培養基中之衍生。將測試不同培養條件以確定取代培養組份(例如，基礎培養基、血清來源、血清替代物產物、人類血清血小板溶解物)是否可富集本文所述有效亞群。將評估不同基礎培養基(包括無動物及經界定培養(無FBS)系統)以培養ESC並製備MSC。具體而言，將使用來自Invitrogen之StemPro® MSC SFM及來自Lonza之MSCM bullet kit來檢查無血清界定培養系統是否將產生具有期望品質及量之ESC-MSC。此外，可使用各種生長因子(例如FGF、PDGF及TGFβ3)以及調節信號傳導途徑或細胞結構之小化學物質來增強ESC-MSC之品質及量。

C. 結果

表現典型標記物CD73 (細胞外-5'-核苷酸酶[26])、CD54(ICAM-1，整合素配體[27])及CD271 (MSC分化抑制劑[28])之ESC-MSC可具有最強活體外免疫抑制效應。

實例8-藉由ESC-MSC之免疫抑制機制

A. 研究ESC-MSC抑制由T細胞介導之適應性免疫反應之方式。

自 PBMC 分離之原初 T 細胞之一般反應係當其經有絲分裂刺激劑 (例如植物凝集素 (PHA) 或佛波醇豆蔻酸酯乙酸酯 (phorbol myristate acetate) (PMA)/離子黴素) 誘導時或當其遇到諸如樹突細胞等抗原呈遞細胞 (APC) 時會增殖。此最佳可例示為 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 細胞在混合白血球反應 (MLR) 分析中之一般增殖。先前研究指示, MSC 可在 MLR 分析中抑制 T 細胞增殖。

檢查吾人 ESC-血管母細胞源 MSC 抑制由化學刺激 (PMA/離子黴素, 圖 10a) 或暴露於 APC (樹突細胞, 圖 11b) 引起之 T 細胞增殖之能力。吾人觀察到, MSC 抑制因化學刺激或與 APC 共培養所致 T 細胞之增殖反應, 且此抑制以劑量依賴方式發生 (圖 10b, 右側圖表)。此外發現, 有絲分裂不活化 MSC (圖 10b) 能夠抑制 T 細胞增殖, 且程度與活 MSC 等效, 從而表明, 有絲分裂不活化 MSC 事實上可在活體內用於免疫抑制。

存在各種功能性 T 細胞子集且其實施參與促炎反應、抗炎反應或誘導 T 細胞無效能之特定作用。可認為調節性 T 細胞 (Treg) 為天然免疫抑制 T 細胞, 且在正常環境中, 負責抑制過敏性自體反應性 T 細胞反應。其通常僅代表一小部分機體 T 細胞, 但其盛行率可受各種環境因子影響。已顯示, MSC 經由誘導 Treg 細胞來誘導周邊耐受 [33-35]。

在 5 天共培養分析中發現, 與先前研究類似, 血管母細胞源 MSC 能夠增加因應 IL2 刺激物誘導之 CD4/CD25 雙陽性 Treg 之百分比 (圖 11a)。來自非附著周邊血單核細胞

(PBMC)之混合T細胞群體與MSC (比率為10 PBMC:1 MSC)之共培養物顯示，當在IL2誘導之培養物中包括MSC時，Treg誘導幾乎倍增。此Treg誘導程度類似於在引用度極高之 Aggarwal 等人研究 (在 Blood, 2005 中公開)。將檢查CD4/CD25雙陽性群體內誘導之FoxP3之量以確認，該等事實上為真正Treg。細胞內流式細胞術、RT-PCR及西方墨點 (Western blot)分析全部將用於研究在MSC不存在及存在下在IL2誘導之T細胞培養物中之FoxP3誘導。非附著PBMC與經純化CD4+ T細胞群體二者皆可在該等分析中用於研究Treg誘導。

認為Th1及Th17細胞在MS及其他自體免疫疾病中起重要作用。將首先利用活體外分析來分析Th1及Th17 CD4+ T細胞之分化及功能；其亦可在EAE模型中或在可採用之其他動物模型中檢查。已開始檢查MSC對活體外Th1誘導之效應。促進Th1自原初CD4+ T細胞特化之培養條件為業內已知 (Aggarwal等人)。已採用該等培養條件 (其包括抗-CD3、抗-CD28及抗-CD4抗體以及人類IL3及IL12)在MSC不存在或存在下自原初非附著PBMC (10 PBMC:1 MSC)誘導Th1細胞。在48小時共培養後，分離非附著細胞，沖洗且在新孔中用PMA/離子黴素刺激16小時。在16小時誘導後，採集上清液且針對Th1細胞介素IFN γ 之分泌進行分析。如所預期發現，在48 hr Th1誘導條件下與MSC一起培養之PBMC不產生與彼等不與MSC一起培養者一樣多之IFN γ 。此指示，MSC可抑制主要Th1細胞功能，即，IFN γ 分泌 (圖

11b)。將藉由以下方式來實施類似研究：在活體外分化Th17細胞，且利用對培養物上清液之ELISA分析來確定MSC對促炎IL17分泌之效應。

已知Th2細胞分泌具有抗炎效應之細胞介素(例如IL4)。MSC能夠增強Th2分化及IL4分泌。與針對Th1細胞之上述實例類似，將在48小時培養系統中使用Th2誘導條件以自含有T細胞之原初PBMC刺激Th2分化。將利用ELISA分析來檢查MSC共培養對IL4分泌之效應。

最近研究已表明，CD8 T細胞亦在EAE模型及MS之潛在機制中起關鍵作用[30]。本發明者將檢查與ESC-MSC活體外共培養是否可影響CD8 T細胞之功能。為達成此目的，將經由使用APC使非附著PBMC或經純化CD8⁺ T細胞暴露於EAE相關MBP110-118肽。此將引起抗原特異性CD8⁺ T細胞群體出現，且可利用CD3/CD28擴增珠粒(Invitrogen)來擴增此一群體。抗原特異性CD8⁺ T細胞之存在可在流式細胞術中利用對MBP-肽具有特異性之五聚物試劑(Proimmune)來驗證。將用載有MBP110-118之APC實施再刺激，以誘導抗原特異性免疫反應，該免疫反應包括抗原特異性CD8⁺ T細胞之擴增與IFN γ 之分泌二者。將比較來自在MSC不存在或存在下培養之T細胞之反應，以確定MSC是否可抑制該等細胞毒性EAE相關抗原特異性T細胞之誘導。五聚物特異性流式細胞術、BrdU納入及ELISA分析將用於此目的。

B. 確定發炎因子及細胞內附著分子(ICAM)是否促成

ESC-MSC之免疫抑制效應。

已顯示，TGF β 、PGE2、IDO、一氧化氮(NO)及ICAM對於MSC之免疫抑制功能至關重要[7]。將利用ELISA分析及流式細胞術來檢查ESC-MSC對該等分子之分泌及ICAM之表現。

已顯示，MSC之活化需要促炎細胞介素IFN γ [23]，且Toll樣受體(TLR)之不同激動劑(例如LPS及聚(I:C))可誘導不同MSC子集[24]。例如，最近已顯示，IFN γ 活化之MSC在小鼠結腸炎模型中之治療功效大於未經處理之MSC(Duijvestein等人2011)。已開始檢查IFN γ 對MSC性質之效應。已用IFN γ 將ESC-MSC活體外處理長達7天，且已產生細胞表面標記物表現之顯著變化。該等發現與先前研究(Gotherstrom等人2004；Rasmusson等人2006；Newman等人2009)中作出之觀察一致，且確認血管母細胞源ESC-MSC以與自機體分離之MSC類似之方式起作用。例如，在靜息狀態中，MSC通常在其細胞表面上不表現許多(<10%) HLA G，而具有此特殊類別之免疫耐受HLA標記物之細胞內儲存物。在7天IFN γ 處理後，HLA G可容易地在細胞表面上檢測到(圖12)且亦可經誘導而分泌(尚未測試)。另外，IFN γ 處理引起細胞表面上CD40表現及HLA DR表現之上調(圖12)。提出該等變化增強其免疫抑制效應。例如，將藉由利用上述活體外共培養分析來確定用IFN γ 預處理MSC是否增強其在以下方面之能力：誘導Treg群體、抑制Th1分泌IFN γ 或增強Th2細胞分泌IL4。IFN γ 亦可影響MSC在MLR

分析中抑制一般T細胞增殖之能力。亦可測試TNF α 、LPS及/或聚I:C對該等類型之MSC免疫抑制性質之效應。

C. 結果

預計，由MSC誘導之Treg之CD4/CD25雙陽性群體亦將表現轉錄因子FoxP3，此乃因已報告功能性Treg上調其因應誘導刺激物之表現。

預計，MSC將一定程度地抑制Th17細胞對IL17之促炎分泌，且MSC亦可顯著增強抗炎症Th2細胞分泌IL4。已在先前研究中作出此等觀察，且其將有助於確認血管母細胞源MSC之真正功能。

ESC-MSC應至少部分地抑制抗原誘導之CD8⁺ T細胞之活化。亦可檢查NK細胞、巨噬細胞及樹突細胞在ESC-MSC共培養後之功能。將檢查ESC-MSC對該等其他類型之免疫細胞之成熟、細胞毒性及/或特異性細胞介素產生之效應。

實例9-ESC-MSC比BM-MSC具有增加效能及更大抑制效應

實施混合淋巴球反應(MLR)分析以確定不同MSC群體是否具有抑制T細胞增殖之不同能力。結果表明，ESC-MSC在其抑制因應促有絲分裂刺激物(「單向MLR」)或抗原呈遞細胞(樹突細胞DC；「雙向」MLR)之T細胞增殖之能力方面比BM-MSC更有效(參見圖13)。

實施「單向」MLR分析如下：人類PBMC係購自AllCells。在將冷凍小瓶解凍後，平鋪PBMC且使其在IMDM+10%熱不活化人類血清中保持至少1小時或過夜，

以選擇性地附著單核球。使用非附著細胞(含有T細胞)作為T細胞反應者之天然來源。使用ESC源MSC或BM源MSC作為抑制劑。該等MSC係活的或經絲裂黴素C進行有絲分裂阻滯。將非附著PBMC與MSC以不同比率混合在一起且將其共培養5天。在第3天，將有絲分裂促進劑、佛波醇-12-豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)及離子黴素或植物凝集素(PHA)添加至培養物以誘導T細胞增殖。在第4天，添加溴去氧尿苷(BrdU)。在第5天，經由用針對CD4、CD8及BrdU之抗體實施流式細胞術染色利用BrdU納入套組(B&D Biosystems)來評價T細胞增殖。T細胞增殖評價為已將BrdU納入DNA中之CD4+及/或CD8+細胞(即，BrdU+)之%。

在「雙向」MLR中，使用ESC源MSC或BM源MSC作為抑制劑，使用非附著周邊血單核細胞(PBMC)作為T細胞反應者之天然來源，且使用單核球源樹突細胞(DC)作為刺激劑。為獲取DC，自PBMC分離塑膠附著單核球。平鋪PBMC且使其在IMDM+10%熱不活化人類血清(10% HuSer)中保持至少1小時或過夜，以選擇性地附著單核球。去除非附著細胞且將附著細胞與SCF、FL、GM-CSF、IL3及IL4一起在IMDM+10% HuSer中培養4天。在此變化形式之分析中，在第3天不添加有絲分裂促進劑。僅在收穫細胞用於如上文所述流式細胞術前16小時至24小時添加BrdU。在此分析中，MSC與DC二者皆經絲裂黴素C進行有絲分裂不活化。

實例 10- 年幼 ESC-MSC 與 BM-MSC 及 年老 ESC-MSC 相比對 Treg 擴增誘導之改良

利用 PBMC 及 MSC 實施共培養實驗，以確定 MSC 之存在是否可誘導 PBMC 群體內之調節性 T 細胞 (Treg) 擴增。結果表明，年幼 ESC-MSC 誘導 Treg 擴增優於 BM-MSC 與年老 ESC-MSC 二者 (參見圖 14 及圖 15)。

利用非附著 PBMC 及不同類型之 MSC (「年幼」ESC 源 (約 p5-6)、「年老」ESC 源 (約 p12 或更高)、BM 源) 以 10:1 比率 (PBMC:MSC) 建立共培養物。將共培養物在 IMDM+10% 熱不活化人類血清+300 單位/ml 重組人類 IL2 中培育 4 天。利用 FoxP3 細胞內流式細胞術染色套組 (Biolegend) 藉由對 CD4、CD25 及 FoxP3 染色陽性之 PBMC 之百分比來 Treg 之存在確定。

實例 11-ESC-MSC 具有更大增殖能力

隨時間監測不同 MSC 群體之生長速率，以確定 MSC 來源是否影響其增殖能力。結果顯示，ESC 源 MSC 比 BM 源 MSC 具有更大增殖能力。結果亦表明，在基質 (例如基質膠) 上培養 ESC-MSC 較長時間 (多達 6 次傳代) 可幫助維持比在較早期傳代 (例如 p2) 自基質移出細胞時更高之生長速率 (參見圖 16 及圖 17)。

將 ESC 源血管母細胞 (p0) 於 α MEM+20% Hyclone FBS+1-麩醯胺酸+非必需胺基酸 (=MSC 生長培養基) 中以 50,000 個細胞/cm² 播種至基質膠塗佈組織培養塑膠上。將骨髓單核細胞 (p0) 於 MSC 生長培養基中以 50,000 個細胞/cm² 播種至

規則組織培養塑膠上。當細胞於p0達到約50%至60%鋪滿或自p1向前(通常每3天至5天)達到70%至80%鋪滿時，利用0.05%胰蛋白酶-edta (Gibco)收穫細胞。在收穫後，使細胞旋轉沈澱，進行計數且以7000個細胞/cm²再平鋪。自基質膠除出ESC-MSC，且除非另有說明，否則隨後使其於p3開始在規則組織培養塑膠上生長。繪製累積群體倍增相對於時間之曲線，以顯示在培養中維持MSC時之細胞生長速率。

實例 12-ESC-MSC經受軟骨形成性分化

為確定不同MSC群體之軟骨形成性潛力，將ESC-MSC或BM-MSC以顆粒團培養物播種且利用分化培養基誘導以分化成軟骨細胞(或保持在作為陰性對照之規則MSC生長培養基中)。結果表明，ESC-MSC以類似於BM-MSC之方式經受軟骨形成。ESC-MSC與BM-MSC顆粒二者經由番紅O染色揭示軟骨性基質(蛋白聚糖)沈積(參見圖18)。

為形成軟骨形成性顆粒培養物，在15 mL錐形管中將 2.5×10^5 個細胞ESC-MSC以500 X g離心5 min。抽吸培養基，且將0.5 mL軟骨形成性培養基(由補充有1 mM丙酮酸鈉(Life Technologies)、0.1 mM抗壞血酸2-磷酸鹽(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、0.1 μ M地塞米松(dexamethasone)(Sigma-Aldrich)、1% ITS (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)、10 ng/mL TGF- β 3(Peprotech, Rocky Hill, NJ)之DMEM-HG (Life Technologies, Gaithersburg, MD)組成)或培養基(對照)添加至顆粒。使顆

粒培養物維持21天，且每2天至3天更換培養基。在21天結束時，用4%多聚甲醛固定顆粒，且將其送至MassHistology (Worcester, MA)以供利用標準程序進行石蠟包埋、切片及番紅O染色。

實例 13-在 IFN γ 或 TNF α 刺激下前列腺素 E2(PGE₂)之增強分泌

ESC-MSC 部分地經由分泌 PGE₂ 來施加免疫調節效應。自 FM ESC-MSC 及 BM-MSC 採集之條件化培養基顯示，在基礎狀態下，BM-MSC 比 FM ESC-MSC 分泌更高含量之 PGE₂。確定刺激條件(不同濃度之 IFN γ 及 / 或 TNF α)下之 PGE₂ 分泌之實驗顯示，FM ESC-MSC 顯著增加其因應刺激之 PGE₂ 分泌(參見圖 19)。實際上，FM ESC-MSC 自基底狀態至刺激狀態對 PGE₂ 分泌之成倍誘導遠遠大於 BM-MSC。然而，FM ESC-MSC 及 BM-MSC 在刺激條件下分泌 PGE₂ 之實際原始量(pg/ml)類似。

將 ESC-MSC 以 7.5×10^6 個細胞 /cm² 平鋪於 6 孔板 (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) 中。使培養物在培養基中維持 24 hr，之後用 10 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml 或 200 ng/ml IFN- γ 及 / 或 10 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/mL TNF- α (Peprotech) 刺激。在 3 天誘導後採集上清液且將其儲存在 -20°C 下。收穫 ESC-MSC 並計數，以將 PGE₂ 含量針對細胞數正規化。利用 ELISA 套組 (R&D PGE₂ 參數或前列腺素 E₂ 表現 EIA 套組，Cayman Chemicals) 量測 PGE₂ 濃度且根據製造商方案利用。

實例 14-ESC-MSC 表型評估

評價不同 MSC 群體上不同細胞表面標記物之表現以確定其個別免疫表型。ESC 源 MSC 可在不同基質上分化。檢查一組細胞表面標記物，以相對於其在 BM-MSC 上之表現確定其在已在三種不同基質(基質膠、纖連蛋白或膠原 I)上獲取之 MSC 上之表現譜。結果顯示該等標記物之表現模式類似，而不管用於其初始分化之基質如何。其超過 95% 對 CD13、29、44、73、90、105、166 及 HLA-ABC 為陽性，而對 CD31、34、45、HLA-DR、FGFR2、CD271 為陰性(參見圖 20A)。Stro-1 表現在 5%(對於 ESC-MSC 而言)至約 30%(對於 BM-MSC 而言)之間變化。

MSC 之生長及群體倍增隨傳代次數增加而減慢。此實驗之目的係考察 FM-ESC-MSC 在傳代 3 次至 17 次時諸多不同 MSC 標記物之表面標記物表現。所有傳代 FM-ESC-MSC 中之細胞皆對 CD90、CD73、CD105、HLA-ABC、CD166、CD13 及 CD44 染色陽性。細胞對 CD34、CD45、TLR3、HLA-DR、CD106、CD133 及 CD271 為陰性(參見圖 20B)。

對於各系/傳代次數而言，依照相同方案。使細胞在 T75 或 T175 燒瓶中之 MSC 培養基中生長。細胞每 3 天至 4 天傳代一次。使細胞傳代係由以下組成：用 PBS 洗滌燒瓶、利用細胞解離培養基 TryPLE Express 採集細胞及用 MSC 培養基洗滌。利用錐蟲藍(trypan blue)針對活力對細胞計數且以 50-100,000 個活細胞/條件等分。使用以下抗體：CD34-

Fitc 、 CD34-PE 、 CD44-Fitc 、 CD73-PE 、 CD106-PE 、 CD45-APC(BD) ； HLA-DR-APC 、 CD90-Fitc 、 HLA-ABC-Fitc 、 CD133-APC 、 CD29 (ebioscience) ； CD166-PE 、 CD105-APC 、 CD13-PE 、 CD13-APC 、 CD271-Fitc 、 CD10-Fitc 、 Stro-1-AF647 、 CD10(Biolegend) ； TLR3-Fitc(Santa Cruz Biotech)。亦添加碘化丙啶作為活力標記物。在室溫下將細胞培育30分鐘，旋轉沈澱，經過40 μ m細胞濾網，且利用Accuri C6流式細胞儀分析。對於各細胞類型而言，針對PI為陰性之MSC群體(FSC對SSC)對細胞進行設門。藉由設門直方圖且利用未經染色細胞群體作為陰性對照來測定陽性%。參見Wagner W等人，Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. **PLoS ONE** (2008). 3(5): e2213. doi:10.1371/journal.pone.0002213；及Musina, R等人，Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues. *Cell Technologies in Biology and Medicine* (2005) 4月，1(2), 504-509。

另外，FM ESC-MSC比FM ESC-MSC及BM-MSC具有更大量之CD10表現及更小Stro-1表現(參見圖21)。在10個不同批次之FM-MA09-MSC中確認此低Stro-1 (5-10%細胞)及中間含量之CD10 (約40%細胞)之表現模式(參見圖22)。亦針對不同群體使用流式細胞術以評估細胞大小(參見圖23)。結果顯示，當細胞在培養中維持較長時間時，BM-MSC之細胞大小增加，而FM ES源MSC維持細胞大小。藉

由流式細胞術點圖上之前向對側向散射來測定細胞大小。使用象限門(quadrant gate)將該圖劃分成4個區。右上象限含有大細胞，即，該區域中之細胞具有大前向散射(細胞體積)亦及高側向散射(粒度)。

收穫ESC-MSC，如先前所提及，且在1X DPBS (Life Technologies)中洗滌。用流動緩衝液(3% FBS；Atlas Biologicals, Fort Collins, CO)洗滌 $75-100 \times 10^5$ 個細胞，之後於冰上與含有一級抗體或同種型對照抗體之100 μ L流動緩衝液一起培育45 min。用2 mL流動緩衝液洗滌細胞且於冰上在含有二級抗體之100 μ L流動緩衝液中培育45 min。將細胞洗滌最後一次且再懸浮於含有碘化丙啶之流動緩衝液中，且在Accuri C6流式細胞儀(Accuri Cytometers公司，Ann Arbor, MI)上分析。

實例15-ESC-MSC中之基因表現分析

該等研究之目的係確定FM-ESC-MSC與BM-MSC間之mRNA表現之相似性及差異。在第一組實驗(基礎實驗)中，藉由定量聚合酶鏈反應(QPCR)比較來自FM-ESC-MSC與BM-MSC之細胞之mRNA表現之相對差異。利用針對各種基因之Taqman探針(Life Technologies)利用 $\Delta\Delta C_t$ 法來確定相對於內源對照GAPDH之表現。自28個基因之列表，在FM-ESC-MSC對BM-MSC之基礎實驗中上調以下基因：AIRE、ANGPT1(ANG-1)、CXCL1、CD10、CD24及IL11(參見圖24至26)。在FM-ESC-MSC對BM-MSC中下調IL6及VEGF(參見圖27)。以下基因在MSC之來源之間無顯著差

異：ALCAM、FGF7、HGF、LGALS1、NT5E及TNFSF1B (數據未顯示)。在任一MSC來源中未檢測到以下基因：ANGPT2、CD31、CD34、CD45、HLA-G、IL2RA、IL3、IL12B (數據未顯示)。作為陰性對照，測試所有MSC之造血祖細胞標記物(CD34、CD41及CD45)之表現。自該等實驗，已確定，FM-ESC-MSC以高於或低於等效BM-MSC之量表現一些基因。

亦藉由用T細胞處理MSC且隨後添加刺激物植物凝集素(PHA)使MSC經受模擬免疫反應之環境刺激。使ESC-MSC在T細胞(未受刺激)或T細胞與PHA(受刺激)存在下生長兩天，然後添加2.5 $\mu\text{g/ml}$ PHA，再保持2天，之後採集RNA。現在比較未受刺激及受刺激ESC-MSC之基因表現與未受刺激及受刺激BM-MSC mRNA之量。

對於基礎實驗而言：在先前所述條件下將FM-ESC-MSC及BM-MSC以在10 cm皿中約500,000個細胞之開始密度培養4天。另外，基礎實驗之陰性對照係MA09 ESC源造血祖細胞。

對於刺激實驗而言：在先前所述條件下將FM-ESC-MSC及BM-MSC以在10 cm皿中約500,000個細胞之開始密度培養3天至4天。隨後使MSC暴露於T細胞2天且隨後+/-暴露於2.5 $\mu\text{g/ml}$ PHA。作為對照，使MSC在T細胞(無PHA)存在下生長，且單獨地，亦使T細胞(有PHA，無MSC)生長。抽吸培養基，在PBS中沖洗2次，且抽吸乾燥。利用RNAeasy套組(Qiagen)依照製造商說明書分離RNA。藉由

利用 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) 來分析 RNA 之濃度及純度。利用 SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Life Technologies) 且利用 1 微克 RNA 作為開始物質實施 cDNA 合成。將 cDNA 稀釋約 30 倍，每孔 5 微升。每孔混合經稀釋 cDNA、1 微升 QPCR Taqman 探針 (Life Technologies) 及 15 微升 SSO Fast Mastermix (Biorad)。在 Biorad CFX 96 上實施 QPCR。利用 CFX manager 2.1 (Biorad) 分析數據。利用內源對照 GAPDH 及 $\Delta\Delta C_t$ 法測定 mRNA 表現之相對量。

實例 16 -ESC-MSC 中之吡啶胺 2, 3-二氧酶(IDO)酶活性

吡啶胺 2, 3-二氧酶(IDO)係參與將色胺酸轉化成犬尿胺酸之酶。IFN γ 活化之 MSC 產生 IDO 且此可部分地負責其抑制 T 細胞增殖之能力，此乃因 IDO 干擾 T 細胞代謝。在此研究中，測試 BM-MSC 相對於 ESC-MSC 之 IDO 活性。在用 IFN γ 刺激細胞或藉由與 T 細胞共培養之前及之後量測 IDO 表現。實驗顯示，所有 MSC 群體在用 IFN γ 刺激後皆顯著增加 IDO 活性(參見圖 28)。

藉由將 IFN γ (50 ng/ml) 添加至培養基或藉由與 T 細胞共培養 3 天來刺激細胞；利用分光光度分析來實施 IDO 表現量測。在刺激後，採集細胞，且溶解 $1-2 \times 10^6$ 個細胞。採集溶解物，且將其與 2X IDO 緩衝液(具有 40 mM 抗壞血酸鹽、20 μ M 亞甲基藍、200 μ g/ml 過氧化氫酶及 800 μ M L-色胺酸之 PBS)以 1:1 混合且在 37°C 下培育 30 分鐘。藉由添加 30% 三氯乙酸終止反應，且在 52°C 下培育 30 分鐘。使溶

解物旋轉沈澱，且將上清液與艾利希試劑 (Ehrlich's reagent)(存於乙酸中之0.8%對二甲基胺基甲苯醛，新製備)以1:1混合。在顯色後，在分光光度計上在492 nm下讀取吸光度。將OD值與0-1000 μ M犬尿胺酸標準物比較，用於評價色胺酸至犬尿胺酸之轉化。

參見Meisel R等人， Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. (2004) 6月15日；103 (12): 4619-21。

參見Braun, D等人 A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase(IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood*. (2005) 10月1日；106 (7): 2375-81。

實例17-Aire-1及普利昂蛋白(Prion-Protein)在ESC-MSC中之表現量

利用西方墨點分析來監測Aire-1及普利昂蛋白(Prp)之表現量，以確定不同MSC群體(基於MSC之細胞來源、獲取方法或傳代次數)之間是否存在差異。Aire-1幫助誘導稀有周邊組織限制性抗原(PTA)之轉錄，該等抗原隨後呈遞於MHC上且平息鄰近T細胞之反應。Aire-1亦可抑制早期T細胞活化因子-1(ETA-1)之表現，以抑制T細胞發炎性反應。已顯示，普利昂蛋白(PrP)增強各種幹細胞群體(造血、神經等)之增殖及自我更新，且其表現可與培養中之不同MSC群體之生長特性相關。結果顯示，兩種蛋白有年齡相關性下降(在考慮加載對照後，該對照對於各試樣而言皆

為肌動蛋白)。FM MA09-MSc似乎維持Aire-1與PrP二者隨時間之表現(參見圖29)。

在12%丙烯醯胺SDS-PAGE凝膠上根據標準方案運行MSC完全細胞溶解物。將蛋白轉移至硝酸纖維素膜，且用存於PBS+0.05% tween 20中之5%乳封阻。用針對Aire-1(Santa Cruz Biotechnology)或普利昂蛋白(Abcam)之抗體、之後HRP-偶聯二級抗體探測膜。在Biorad GelDoc成像系統上分析前，利用增強之化學發光試劑來產生信號。

參見，Parekkadan等人，Molecular Therapy 20 (1): 178-186 (2011)。

參見，Mohanty等人，Stem Cells 30: 1134-1143 (2012)。

實例18-ESC-MSc對細胞介素之分泌

已知在基底狀態與因應各種刺激物二者下，MSC皆分泌多種細胞介素及生長因子。利用細胞介素陣列分析超過20種不同分泌因子。結果顯示，在基底狀態與受刺激狀態二者下，ESC-MSc與BM-MSc之間在分泌因子方面存在幾個關鍵差異。在基底狀態與IFN γ 刺激狀態二者下，BM-MSc比ESC-MSc表現更高量之VEGF及IL6(參見圖30至32)。

首先平鋪等數目之MSC，且在平鋪後3天至4天採集MSC之條件化培養基。使CM短暫地旋轉沈澱以去除細胞碎片，且隨後在-20℃下冷凍。將CM解凍以供在RayBiotech(Norcross, GA)定製膜陣列上或在各種R&D Systems(Minneapolis, MN)現成細胞介素陣列上根據製造商方案進行分析。

所引用參考文獻

1. Zappia, E. 等人, *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. Blood, 2005. 106(5):第 1755-61 頁。
2. Gerdoni, E. 等人, *Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann Neurol, 2007. 61(3):第 219-27 頁。
3. Lanza, C. 等人, *Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo* J Neurochem, 2009. 110(5):第 1674-84 頁。
4. Rafei, M. 等人, *Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Mol Ther, 2009. 17(10):第 1799-803 頁。
5. Rafei, M. 等人, *Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th 17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner*. J Immunol, 2009. 182(10):第 5994-6002 頁。
6. Constantin, G. 等人, *Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. Stem Cells, 2009. 27(10):第 2624-35 頁。
7. Uccelli, A. 及 D.J. Prockop, *Why should mesenchymal*

- stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases?* Curr Opin Immunol, 2010. 22(6):第 768-74 頁。
8. Ohtaki, H. 等人, *Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(38):第 14638-43 頁。
 9. Barberi, T. 等人, *Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells.* PLoS Med, 2005. 2(6):第 e161 頁。
 10. Hwang, N.S. 等人, *In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(52):第 20641-6 頁。
 11. Olivier, E.N. 、 A.C. Rybicki 及 E.E. Bouhassira, *Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells.* Stem Cells, 2006. 24(8):第 1914-22 頁。
 12. Brown, S.E. 、 W. Tong 及 P.H. Krebsbach, *The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells.* Cells Tissues Organs, 2009. 189(1-4):第 256-60 頁。
 13. Karlsson, C. 、 Emanuelsson, K. 、 Wessberg, F. 、 Kajic, K. 、 Axell, M. Z. 、 Eriksson, P. S. 、 Lindahl, A. 、 Hyllner, J. 及 Strehl, R., *Human embryonic stem cell-*

- derived mesenchymal progenitors-Potential in regenerative medicine. Stem Cell Res.*, 2009. 3(1): 39-50。
14. Lu, S. J.、Feng, Q.、Caballero, S.、Chen, Y.、Moore, M. A.、Grant, M. B.及Lanza, R., *Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells*, *Nat. Methods* 4 (2007) 501-509。
 15. Lu, S. J.、Luo, C.、Holton, K.、Feng, Q.、Ivanova, Y.及Lanza, R., *Robust generation of hemangioblastic progenitors from human embryonic stem cells*, *Regen. Med.* 3 (2008) 693-704。
 16. Klimanskaya, I.、Chung, Y.、Becker, S.、Lu, S.-J.及Lanza, R., *Human embryonic stem-cell lines derived from single blastomeres*, *Nature* 444 (2006) 481-485。
 17. Madsen, L.S.等人，*A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor*. *Nat Genet*, 1999. 23(3):第343-7頁。
 18. Stromnes, I.M.及J.M. Goverman, *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis*. *Nat Protoc*, 2006. 1(4):第1952-60頁。
 19. Liang, J.等人，*Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 2009. 15(5):第644-6頁。
 20. Costa, M.等人，*The ESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny*. *Nat*

- Methods, 2005. 2(4):第 259-60 頁。
21. Pomper, M.G. 等人, *Serial imaging of human embryonic stem-cell engraftment and teratoma formation in live mouse models*. Cell Res, 2009. 19(3): 第 370-9 頁。
 22. Phinney, D.G. 及 D.J. Prockop, *Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views*. Stem Cells, 2007. 25(11):第 2896-902 頁。
 23. Ryan, J.M. 等人, *Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells*. Clin Exp Immunol, 2007. 149(2):第 353-63 頁。
 24. DelaRosa, O. 及 E. Lombardo, *Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential*. Mediators Inflamm, 2010. 2010:第 865601 頁。
 25. English, K. 等人, *IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells*. Immunol Lett, 2007. 110(2): 第 91-100 頁。
 26. Barry, F. 等人, *The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human*

- mesenchymal stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 289(2):第 519-24 頁。
27. Alhadlaq, A. 及 J.J. Mao, *Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics*. *Stem Cells Dev*, 2004. 13(4):第 436-48 頁。
28. Mikami, Y. 等人, *CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages*. *Stem Cells Dev*, 2010。
29. Di Nicola, M. 等人, *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. *Blood*, 2002. 99(10):第 3838-43 頁。
30. Johnson, T.A.、F.R. Jirik 及 S. Fournier, *Exploring the roles of CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of autoimmune demyelination*. *Semin Immunopathol*, 2010. 32(2):第 197-209 頁。
31. Huseby, E.S.、C. Ohlen 及 J. Goverman, *Cutting edge: myelin basic protein-specific cytotoxic T cell tolerance is maintained in vivo by a single dominant epitope in H-2k mice*. *J Immunol*, 1999. 163(3):第 1115-8 頁。
32. Tang, Q. 及 J.A. Bluestone, *Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity*. *Immunol Rev*, 2006. 212:第 217-37 頁。

33. Boumaza, I. 等人 , *Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia.* J Autoimmun, 2009. 32(1):第 33-4 頁 。
34. Maccario, R. 等人 , *Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype.* Haematologica, 2005. 90(4):第 516-25 頁 。
35. Locatelli, F. 、 R. Maccario 及 F. Frassoni, *Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?* Haematologica, 2007. 92(7):第 872-7 頁 。
36. Wan, Y.Y. 及 R.A. Flavell, *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(14):第 5126-31 頁 。
37. Duijvestein 等人 , Stem Cells 29 (10): 1549-1558 (2011) 。
38. Liang 等人 , Cell Transplant 20 (9): 1395-1408 (2011) 。
39. Pizarro 等人 , Trends Mol Med 9 (5): 218-222 (2003) 。

40. Copland等人，IOVS 49 (12): 5458-5465 (2008)。
41. Wakitani等人，Osteoarthritis and Cartilage 10: 199-206 (2002)。
42. Mobasher等人，Histol. Histopathol 24 (3): 347-366 (2009)。
43. Noth等人，Nat Clin Pract Rheumato 4(7): 371-380 (2008)。
44. Gothenstrom等人，Am J Obstet Gynecol 190(1): 239-45 (2004)。
45. Rasmusson等人，Exp. Cell Research 312(12): 2169-79 (2006)。
46. Newman等人，Inflamm Allergy Drug Targets 8(2): 110-123 (2009)。
47. Le Blanc等人，Exp. Hematol. 31: 890-896 (2003)。
48. Liu等人，J. of Immunol. 176: 2864-2871 (2006)。

本文所引用各文件(例如，美國專利、美國公開申請案、非專利文獻等)皆以全文引用方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1自多能細胞產生FM-MA09-MSC。此圖顯示經由血管母細胞自ESC產生間葉基質細胞之顯微視圖。

圖2自多能細胞源血管母細胞獲得之FM-MA09-MSC之表型。此圖顯示在初始血管母細胞群體中(圖表左側，7天至11天血管母細胞)及在基質膠塗佈板上培養血管母細胞後(圖表右側)，對MSC表面標記物為陽性之細胞之百分比，

以及源自血管母細胞之間葉基質細胞之顯微視圖(右側照片)。

圖3自不同培養方法獲取之間葉基質細胞之表型。此圖顯示在明膠塗佈板上培養人類胚胎幹細胞(ESC)後(左圖)、在基質膠塗佈板上培養ESC後(中圖)及在基質膠塗佈板上培養血管母細胞後(右圖)，對MSC表面標記物為陽性之細胞之百分比。

圖4自多能細胞之間葉基質細胞產量。此圖顯示得自在明膠塗佈板上培養之ESC(第一欄-無產量)、在基質膠塗佈板上培養之ESC(第二欄)及在基質膠塗佈板上培養之血管母細胞(第三欄)之對MSC表面標記物為陽性之細胞之產量。

圖5間葉基質細胞標記物之獲得。此圖繪示欲利用血管母細胞(上方線條)及ESC(下方線條)獲得MSC表面標記物之時間。

圖6自不同培養方法獲取之間葉基質細胞之表型。此圖顯示在基質膠塗佈板上培養ESC(左圖)及在基質膠塗佈板上培養血管母細胞(右圖)後，對MSC標記物為陽性且對造血作用及內皮標記物為陰性之細胞之百分比。

圖7展示FM-MA09-MSC之分化能力。此圖繪示源自血管母細胞(自MA09 ESC分化)之間葉基質細胞形成脂肪細胞及骨細胞之分化能力。

圖8 MSC軟骨形成性分化。此圖藉由聚集蛋白聚糖(硫酸軟骨素蛋白聚糖1)及膠原IIa之mRNA表現繪示MA09 ESC

血管母細胞源間葉基質細胞之軟骨形成性分化。聚集蛋白聚糖(硫酸軟骨素蛋白聚糖1)於第15天出現。膠原IIa於第15天開始出現。

圖9 FM-MA09-MSC中CD309之瞬時表現。此圖顯示細胞表面標記物CD309之瞬時表現。

圖10A FM-MA09-MSC抑制因應有絲分裂促進劑之T細胞增殖。此圖顯示血管母細胞源間葉基質細胞對因化學刺激(PMA/離子黴素)引起之T細胞增殖之抑制。

圖10B FM-MA09-MSC抑制因應抗原呈遞細胞之T細胞增殖。此圖顯示血管母細胞源間葉基質細胞對因暴露於樹突細胞引起之T細胞增殖之抑制。

圖11 FM-MA09-MSC抑制因應抗原呈遞細胞之T細胞增殖。圖11A顯示，血管母細胞源間葉基質細胞能夠增加因應IL2刺激物誘導之CD4/CD25雙陽性Treg之百分比。

圖11B顯示，血管母細胞源間葉基質細胞抑制Th1分泌IFN γ 。

圖12促炎細胞介素IFN γ 刺激FM-MA09-MSC表面標記物表現之變化。此圖顯示，干擾素 γ 刺激MSC表面標記物表現之變化且可增強MSC免疫抑制效應。

圖13 FM-MA09-MSC與BM-MSC相比，效能有所增加，抑制效應更大。FM-MA09-MSC對T細胞增殖施加比BM-MSC更大之抑制效應。(A.) 增加與PBMC共培養之MSC之量使因應PMA及離子黴素之T細胞增殖以劑量依賴性方式降低。年幼(p4) FM-MA09-MSC在所測試所有細胞類型中係最有效的。(B.) FM-MA09-MSC以大於BM-MSC之程度抑制因應PHA之T細胞增殖。將PBMC:MSC以5:1比率共培

養6天。(C.) FM-MA09-MS C抑制因應樹突細胞量增加之T細胞增殖優於BM-MS C。在(A至C)中，T細胞增殖%係藉由在CD4+及/或CD8+細胞群體中納入BrdU來評價。

圖 14 FM-MA09-MS C增強Treg誘導：早期傳代MS C的效應大於晚期傳代MS C。在FM-MA09-MS C不存在或存在下將非附著PBMC (不同供體)培養(+/- IL2) 4天。CD4/CD25雙陽性Treg之%係藉由流式細胞術評價。使用年幼(p6)或年老(p16-18) FM-MA09-MS C。黑色條形指示6次實驗之平均值。就整體而言，MS C對Treg之誘導具有統計學顯著效應。(p=0.02)。

圖 15 FM-MA09-MS C與BM-MS C相比增強Treg擴增。FM-MA09-MS C誘導Treg擴增優於BM-MS C。(A.) CD4/CD25雙陽性Treg之成倍增加。將-IL2條件設定為1，且將其他組表示為相對於此水準之成倍誘導。MM=MA09-MS C，BM=骨髓MS C。「p」=傳代次數。(B.) FM MA09-MS C (MM)誘導CD4/CD25/FoxP3三重陽性Treg優於BM-MS C。(C.)呈CD4+之反應性PBMC之%在不同處理組間係一致的。(D.)呈CD25+之反應性PBMC之%在不同處理組間有所變化。FM-MA09-MS C誘導CD25表現強於BM-MS C。此差異可解釋誘導Treg之差異。

圖 16 FM-MA09-MS C比BM-MS C具有更大增殖能力。FM-MA09-MS C比BM-MS C具有更大增殖能力。繪製累積群體倍增相對於培養天數之曲線。在初始平鋪ESC源血管母細胞或骨髓源單核細胞後，將附著細胞視為p0 MS C。

以 7000 個細胞/sq cm 之密度再平鋪連續 MSC 傳代物且在培養物鋪滿約 70% 時(每 3 天至 5 天)收穫。

圖 17 產生 FM-MA09-MSC 之過程；基質膠效應。於早期傳代(即，p2)時自基質膠移出細胞與彼等維持於基質膠上直至 p6 者相比可暫時減緩 MSC 生長。

圖 18 BM-MSC 及 FM-MA09-MSC 經受軟骨形成。在 21 天後對石蠟包埋之顆粒團培養物實施番紅 O 染色(指示軟骨性基質沈積)。影像係 40X。

圖 19 在基底狀態下，FM-MA09-MSC 比 BM-MSC 分泌更少 PGE2，但在 IFN γ 或 TNF α 刺激後，成倍增加更大。(A.) 顯示 BM-MSC 相對於 FM-MA09-MSC 在基底或不同刺激條件下之前列腺素 E2 分泌量(pg/ml)。將 PGE2 量針對細胞數正規化。(B.) 將基底 PGE2 值設定為 1 (黑線)，且將不同刺激物下之 PGE2 分泌表示為相對於基底水準之成倍增加。

圖 20 FM-MA09-MSC 隨時間維持表型。不同 MSC 群體之流式細胞術分析。(A.) 在三種不同基質上維持 FM-MA09-MSC 之細胞表面標記物表現，且將其與 BM-MSC 比較。(B.) 評估 FM-MA09-MSC 隨時間(利用連續傳代，如所指示)之細胞表面標記物表現。

圖 21 FM-MA09-MSC 與 BM-MSC 相比表現更少 Stro-1 及更多 CD10。不同 MSC 群體之流式細胞術分析。在所指示傳代次數下，FM-MA09-MSC 中之 Stro-1 表現低於 BM-MSC。FM-MA09-MSC 中之 CD10 表現高於 BM-MSC。兩種 MSC 群體之其他標記物相同。

圖 22 10個不同批次之早期傳代FM-MA09-MSC中之Stro-1及CD10表現一致地顯示低Stro-1及中間範圍之CD10表現。不同MSC群體之流式細胞術分析。在所指示傳代次數下評估10個不同批次之FM-MA09-MSC之Stro-1及CD10表現。Stro-1在不同批次之FM-MA09-MSC中一致地較低(平均值為5%至10%)。CD10在不同批次之FM-MA09-MSC中一致地為中間範圍(平均值為約40%)。

圖 23 FM-MA09-MSC隨其培養老化維持其大小，而BM-MSC細胞之大小隨年齡而增加。利用基於流式細胞術之前向散射/側向散射點圖(顯示於左側)來獲取MSC之大小。監測右上象限中「大」細胞之細胞百分比且以條形圖表展示。

圖 24與BM-MSC相比，CD10及CD24在FM-MA09-MSC中有所上調。顯示在基底狀態下對BM-MSC及FM-MA09-MSC之基因表現分析。利用以Taqman探針進行之定量RT-PCR來評價所指示基因之表現且將其針對兩個管家基因正規化。顯示一式四份讀數之平均值 $\pm$ 標準偏差。

圖 25與BM-MSC相比，Aire-1及IL-11在FM-MA09-MSC中有所上調。顯示在基底狀態下對BM-MSC及FM-MA09-MSC之基因表現分析。利用以Taqman探針進行之定量RT-PCR來評價所指示基因之表現且將其針對兩個管家基因正規化。顯示一式四份讀數之平均值 $\pm$ 標準偏差。

圖 26與BM-MSC相比，Ang-1及CXCL1在FM-MA09-MSC中有所上調。顯示在基底狀態下對BM-MSC及FM-MA09-

MSC之基因表現分析。利用以Taqman探針進行之定量RT-PCR來評價所指示基因之表現且將其針對兩個管家基因正規化。顯示一式四份讀數之平均值 $\pm$ 標準偏差。

圖 27 與 BM-MSC 相比，IL6 及 VEGF 在 FM-MA09-MSC 中有所下調。顯示在基底狀態下對 BM-MSC 及 FM-MA09-MSC 之基因表現分析。利用以Taqman探針進行之定量RT-PCR來評價所指示基因之表現且將其針對兩個管家基因正規化。顯示一式四份讀數之平均值 $\pm$ 標準偏差。

圖 28 FM-MA09-MSC 及 BM-MSC 顯示因應 3 天之 IFN γ 刺激而增強之吲哚胺 2,3 二氧酶 (IDO) 活性。比較經 50 ng/ml IFN γ 刺激 3 天之 MSC 將色胺酸轉化成犬尿胺酸之能力 (指示 IDO 活性)。對於各 MSC 群體而言，將 1,000,000 個細胞溶解並用於分析。

圖 29 Aire-1 及 普利昂蛋白 (PrP) 之 FM-MA09-MSC 表現之年齡相關性變化，該兩種蛋白分別參與免疫抑制及增殖。在不同傳代次數 (p) 下對 FM-MA09-MSC 全細胞溶解物中 Aire-1 及 PrP 表現之西方墨點分析。顯示肌動蛋白表現作為加載對照。藉由參照肌動蛋白加載對照來顯示 Aire-1 及 PrP 表現之差異。

圖 30 在基底狀態下，FM-MA09-MSC 比 BM-MSC 分泌更少 IL6。細胞介素陣列顯示在 MSC 條件化培養基中用於正規化 (左側 4 個點) 及 IL6 (帶框) 之陽性對照。比較來自兩種不同供體之 BM-MSC 與 4 個不同批次之 FM-MA09-MSC。

圖 31 在基底狀態及 IFN γ 刺激狀態下，FM-MA09-MSC 比

BM-MSC 分泌更少 IL6。細胞介素陣列顯示在 MSC 條件化培養基中用於正規化(左側 4 個點)及 IL6(帶框)之陽性對照。比較在 48 小時 +/- IFN γ 處理後傳代 7 次之 BM-MSC 與 p7 FM-MA09-MSC。

圖 32 在基底狀態及 IFN γ 刺激狀態下，FM-MA09-MSC 比 BM-MSC 分泌更少 VEGF。細胞介素陣列顯示在 MSC 條件化培養基中用於正規化(左側 4 個點)及 VEGF (帶框)之陽性對照。比較在 48 小時 +/- IFN γ 處理後傳代 7 次之 BM-MSC 與 p7 FM-MA09-MSC。

七、申請專利範圍：

1. 一種產生間葉基質細胞之方法，其包含

在血管內皮生長因子(VEGF)及成骨蛋白4(BMP-4)存在下，在無血清培養基中於低附著基質上培養人類多能幹細胞，及

產生間葉基質細胞，其中相較於骨髓間葉基質細胞，該等間葉基質細胞之CD24表現係上調。

2. 如請求項1之方法，進一步包含每3至4天傳代培養中之該等間葉基質細胞一次。
3. 如請求項1之方法，進一步包含將該等間葉基質細胞自培養物移出做為第三傳代間葉基質細胞。
4. 如請求項1之方法，進一步包含將該等間葉基質細胞自培養物移出做為第四傳代間葉基質細胞。
5. 如請求項1之方法，進一步包含將該等間葉基質細胞自培養物移出做為第五傳代間葉基質細胞。
6. 如請求項1之方法，其中該等間葉基質細胞相對於骨髓源間葉基質細胞具低Stro-1表現量。
7. 如請求項1之方法，其中該等間葉基質細胞能夠增強調節性T (Treg)細胞之誘導，以產生CD4及CD25表現為陽性之Treg細胞。
8. 如請求項1之方法，其中該等間葉基質細胞能夠增強調節性T (Treg)細胞之擴增，以產生CD4、CD25及FoxP3表現為陽性之Treg細胞。
9. 如請求項1之方法，其中該等間葉基質細胞能夠在培養

中進行至少10次群體倍增。

10. 如請求項9之方法，其中該至少10次群體倍增發生於27天內。

11. 如請求項9之方法，其中該等間葉基質細胞能夠在培養中進行至少20次群體倍增。

12. 如請求項11之方法，其中該等間葉基質細胞能夠在培養中進行至少25次群體倍增。

13. 如請求項1之方法，其中該等間葉基質細胞相對於傳代1(P1)、傳代2(P2)、傳代3(P3)、傳代4(P4)及/或傳代5(P5)骨髓源間葉基質細胞，具有在統計學上顯著降低之蛋白膜聯蛋白A1(ANXA1)、A2(ANXA2)、A5(ANXA5)、電壓依賴性陰離子選擇性通道蛋白1 (VDAC1)及/或甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAPDH)含量。

14. 如請求項1之方法，其中該等間葉基質細胞在免疫調節分析中之效能大於骨髓源間葉基質細胞之效能。

15. 如請求項14之方法，其中該效能係藉由測定EC50劑量之免疫調節分析來分析。

16. 一種具有至少 10^3 個人類間葉基質細胞之製劑，其中相較於骨髓間葉基質細胞，該等間葉基質細胞之CD24表現係上調，且其中該等間葉基質細胞中介白素-6(IL-6) mRNA表現量低於骨髓間葉基質細胞中IL-6 mRNA表現量。

17. 一種具有至少 10^3 個人類間葉基質細胞之製劑，其中相較於骨髓間葉基質細胞，該等間葉基質細胞之CD24表現係上調，且其中該等間葉基質細胞中介白素-6(IL-6) mRNA

表現量低於骨髓間葉基質細胞中IL-6 mRNA表現量，且其中該等間葉基質細胞係藉由包含在產生間葉基質細胞之條件下培養人類多能細胞之方法產生。

18. 一種產生間葉基質細胞之方法，其包含

在血管內皮生長因子(VEGF)及成骨蛋白4(BMP-4)存在下，在無血清培養基中於低附著基質上培養人類多能幹細胞；

產生間葉基質細胞，其中相較於骨髓間葉基質細胞，該等間葉基質細胞之CD24表現係上調；及

分離該等具上調之CD24表現之間葉基質細胞。

19. 如請求項18之方法，進一步包含將該分離之間葉基質細胞與醫藥上可接受之載劑調配且產生醫藥製劑。

八、圖式：

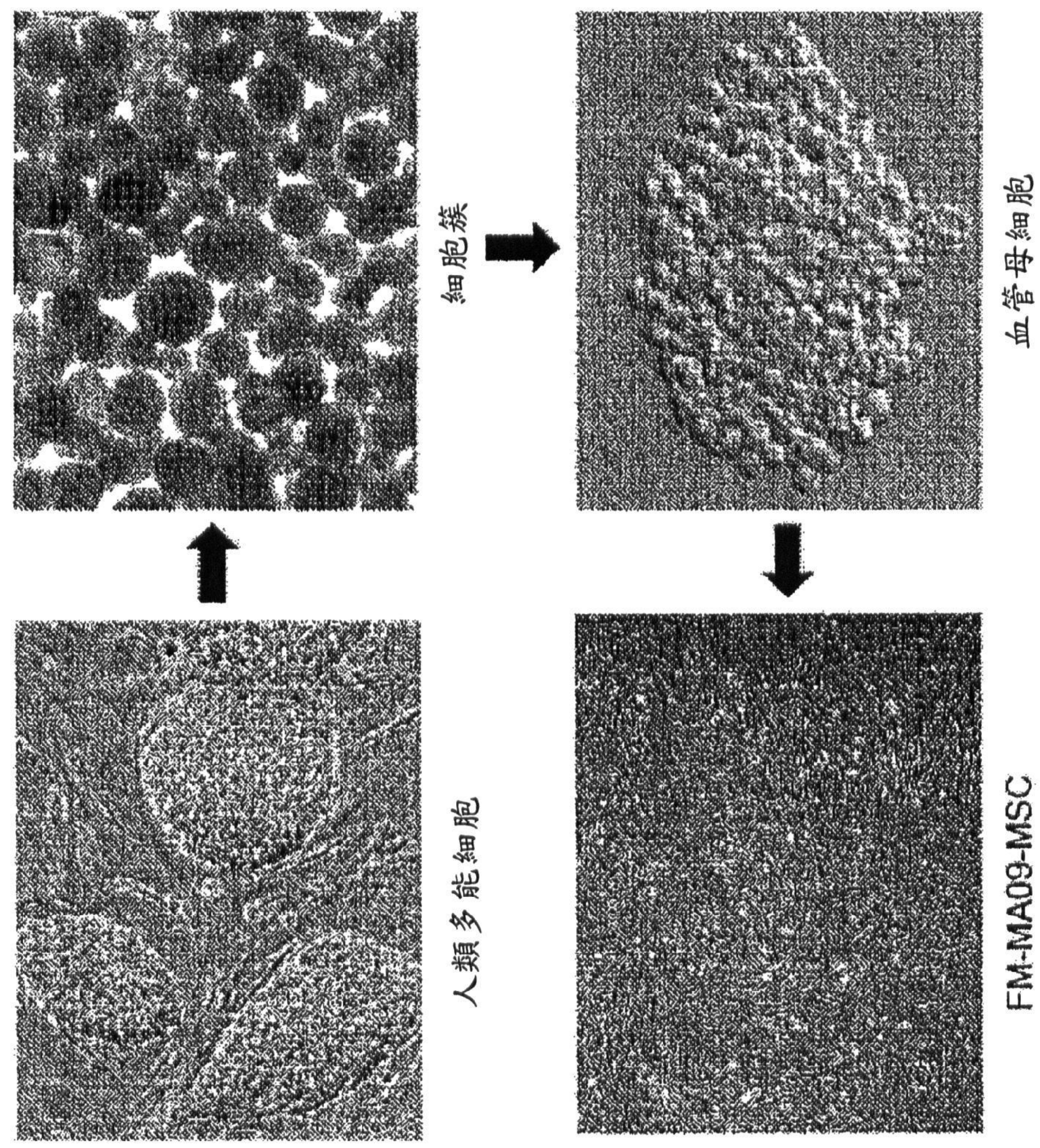
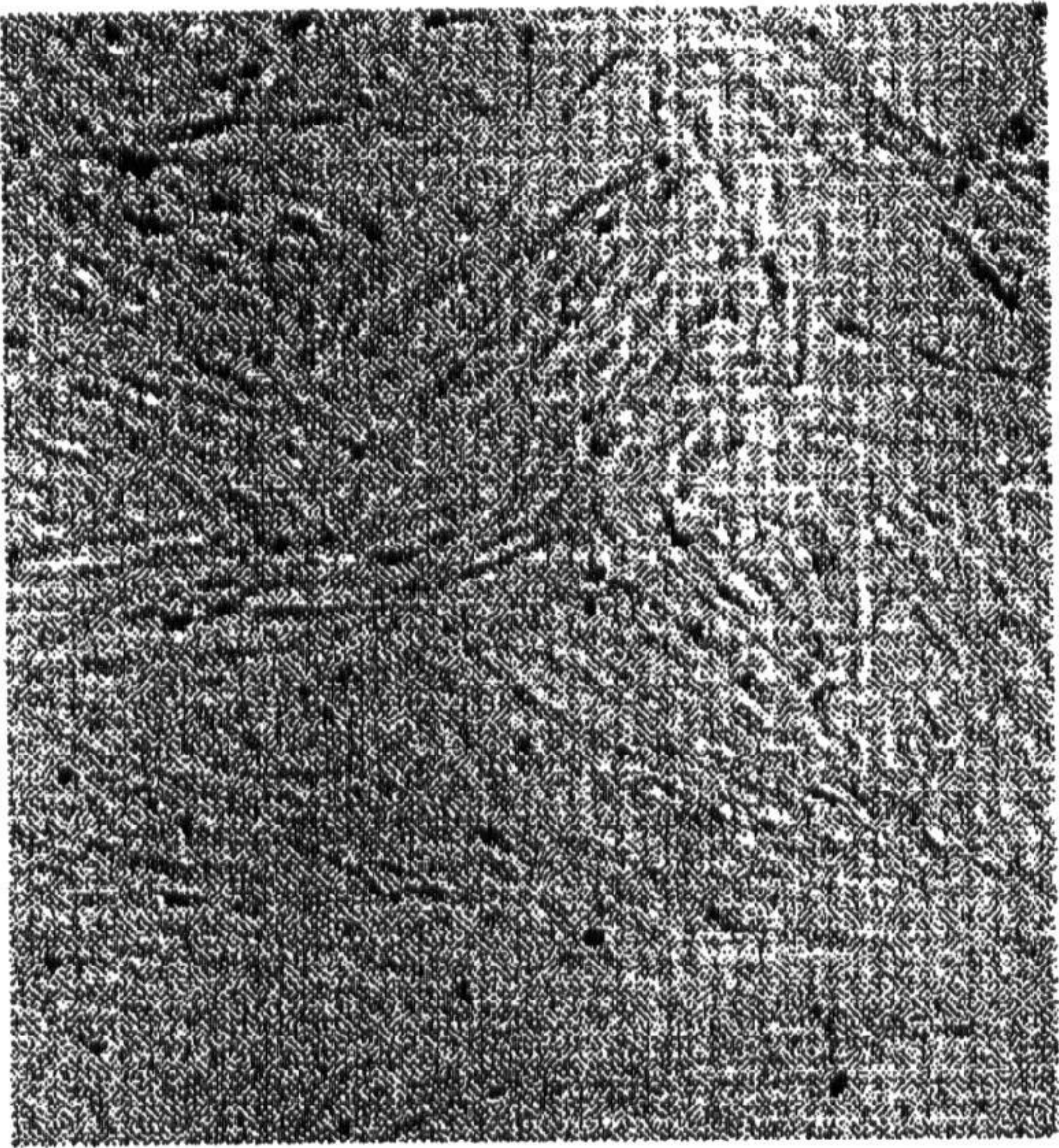
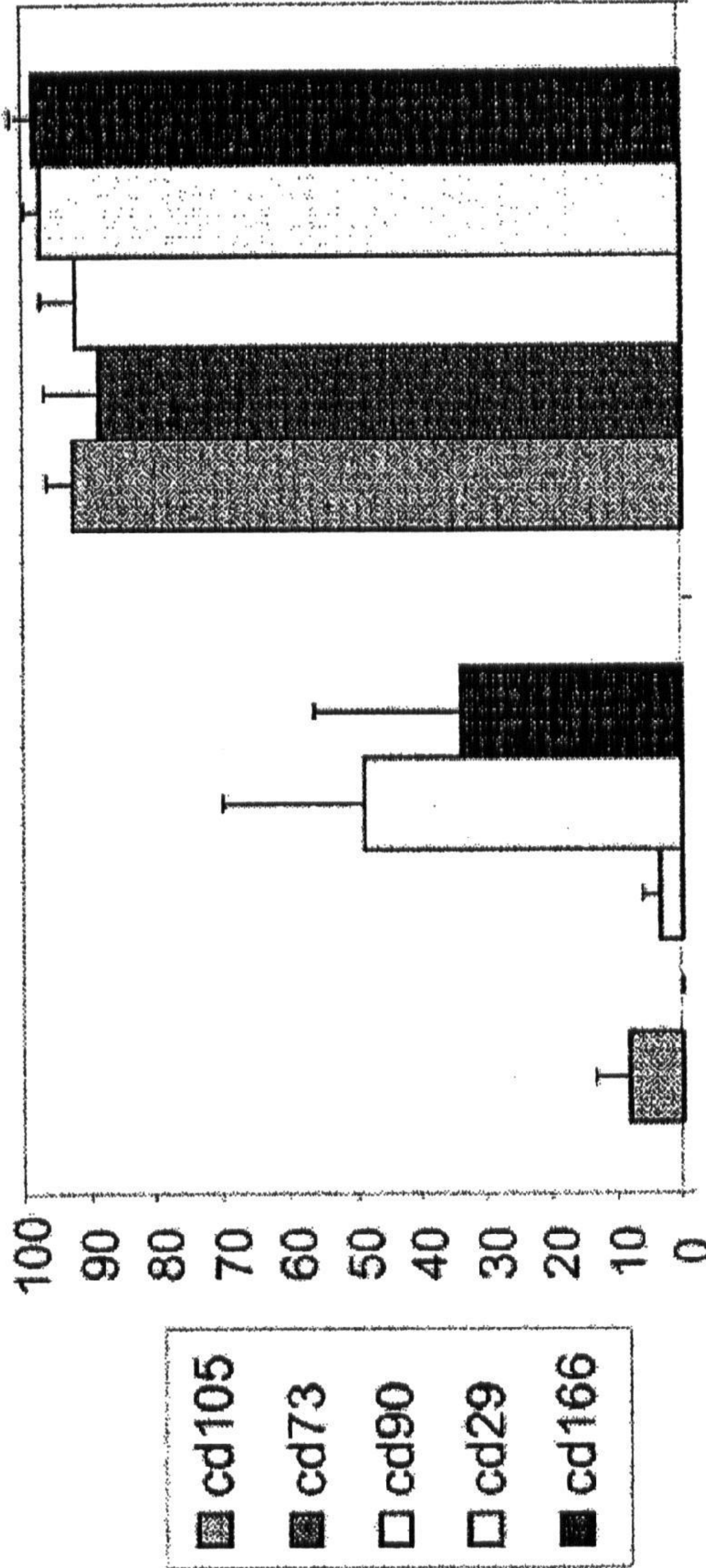


圖1



FM-MA09-MSC, 10x



d22-23 FM-MA09-MSC

D7-11 血管母細胞

圖2

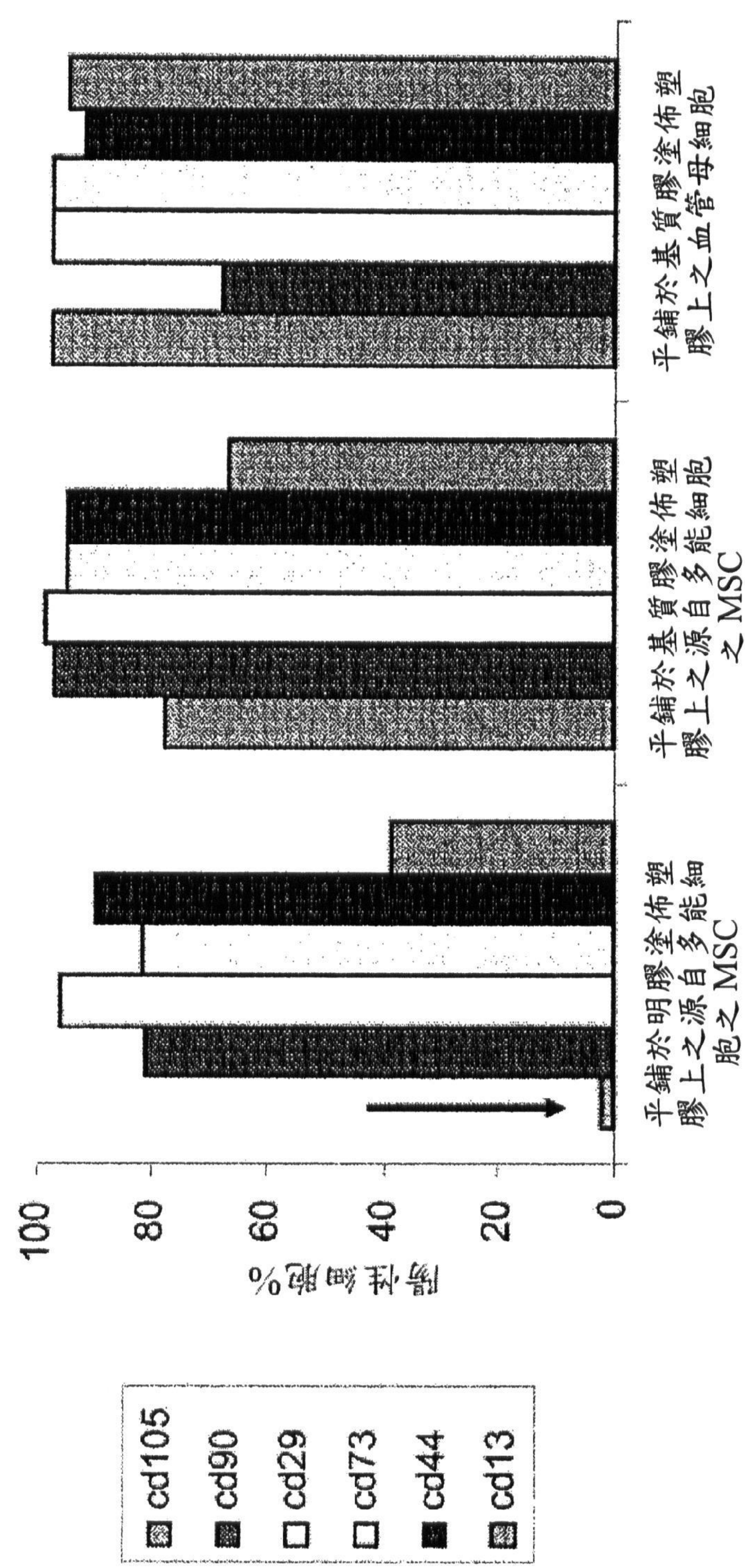


圖3

開始多能細胞之數目：	平鋪於明膠塗佈塑膠上之源自MSC	平鋪於基質膠塗佈塑膠上之源自MSC	平鋪於基質膠塗佈塑膠上之血管母細胞
產量：	300,000 n/a	350,000 4,000,000 個	約 200,000 85,000,000 個
產量採集於以下時間：	n/a	48 天	44 天

圖4

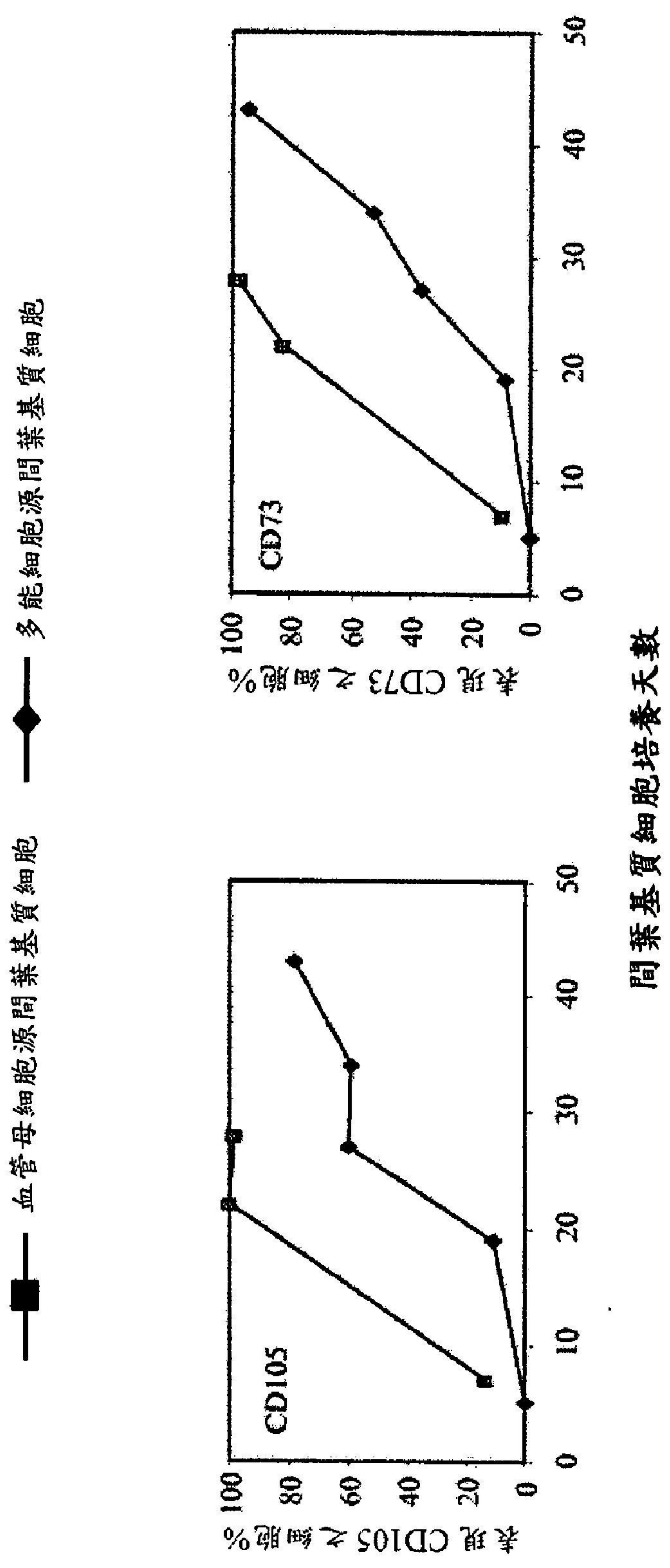


圖5

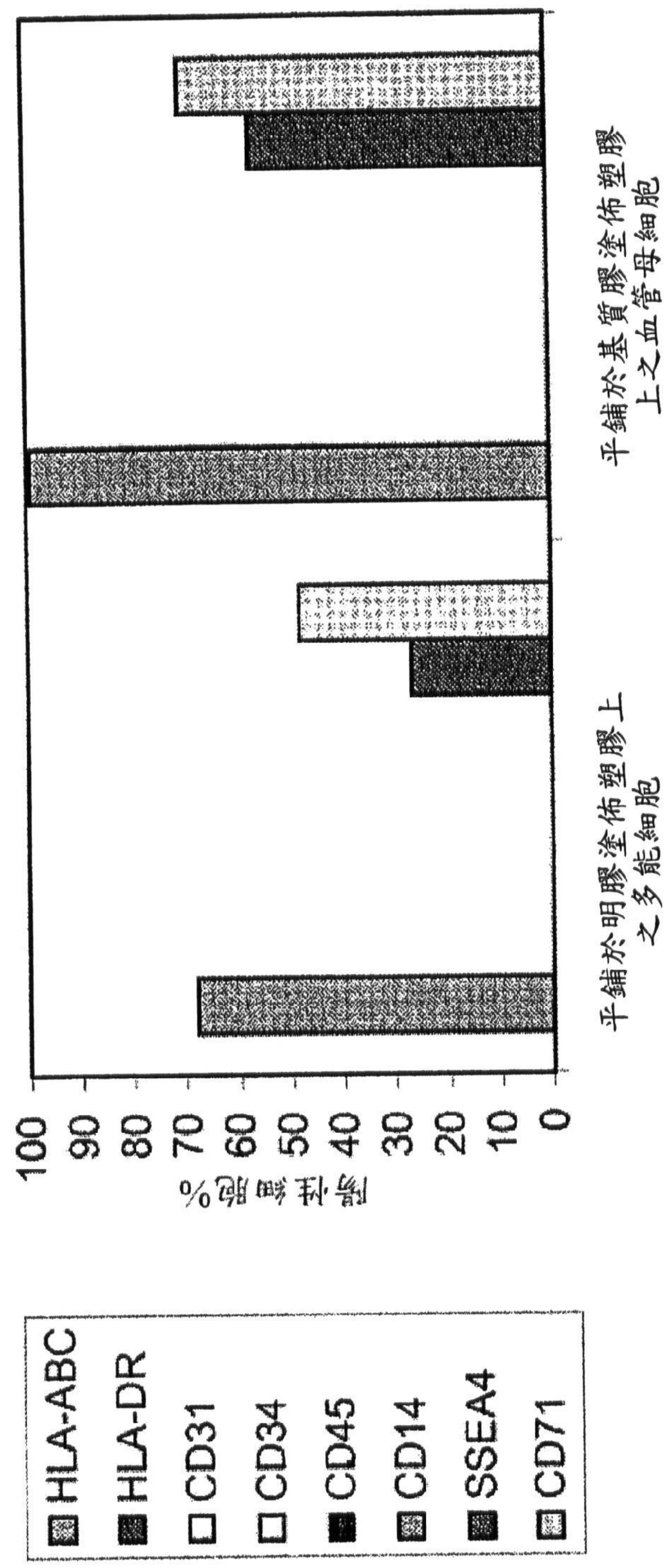


圖6

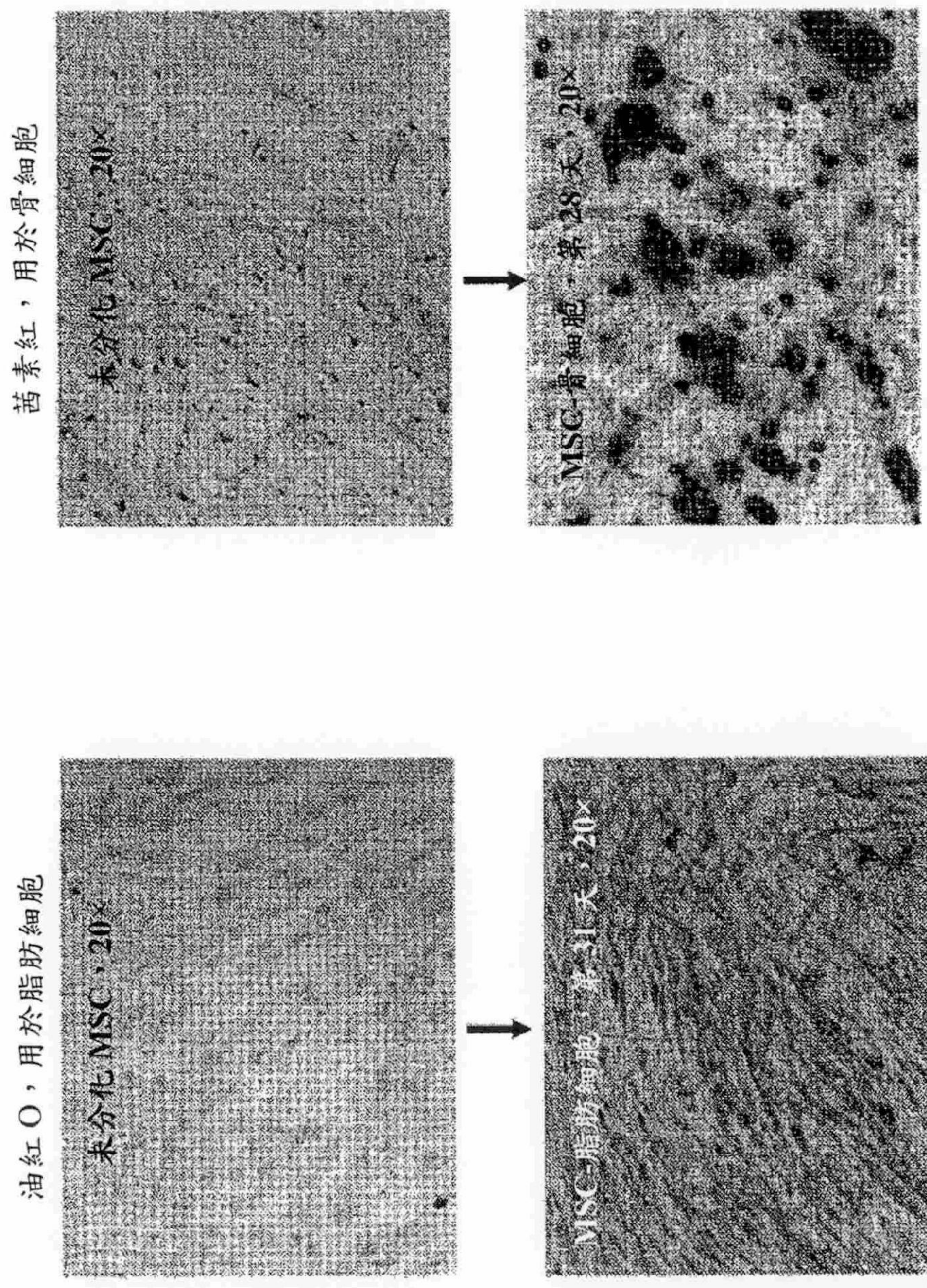


圖7

第 101145218 號專利申請案
中文圖式替換頁(105 年 12 月 8 日)

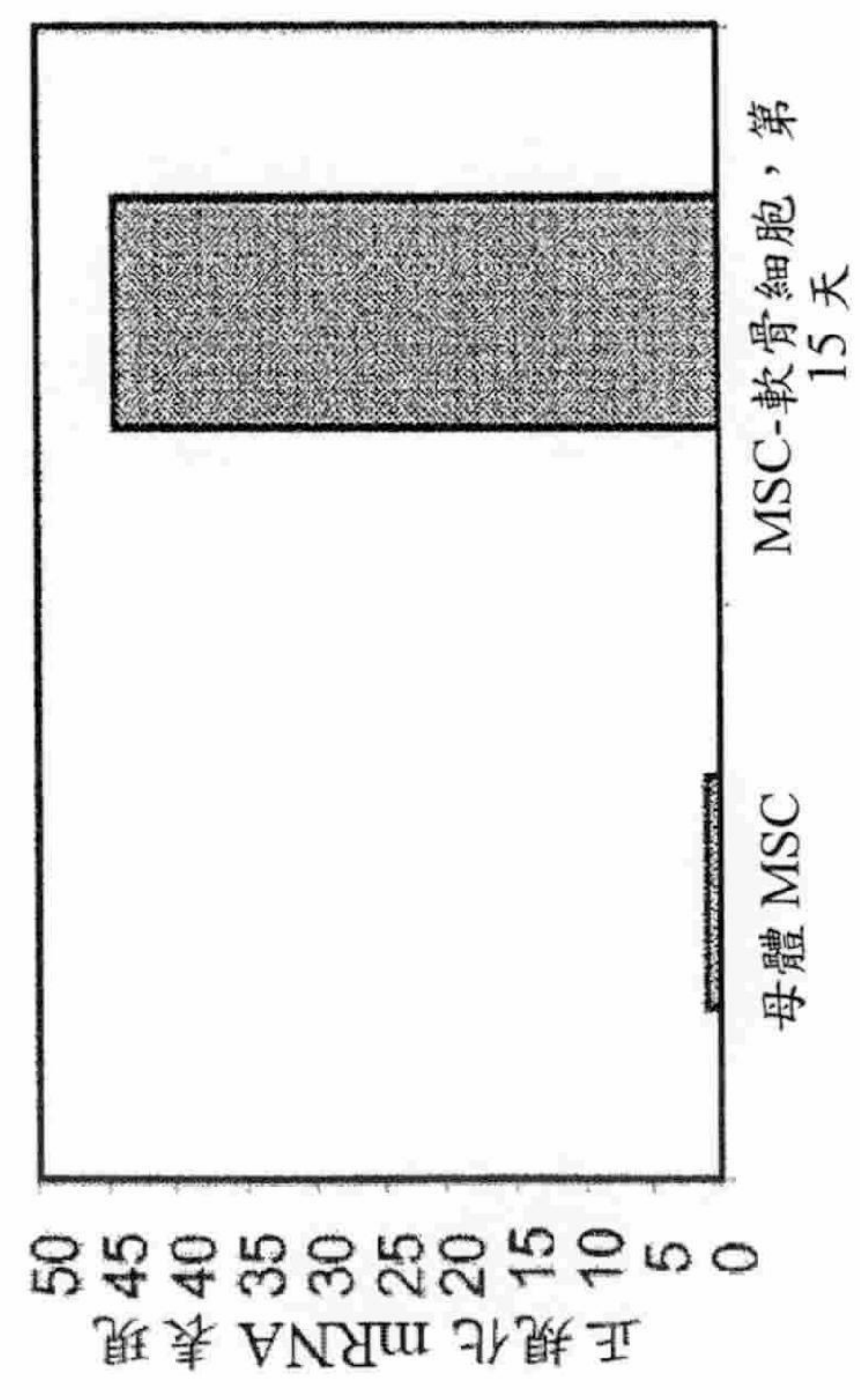
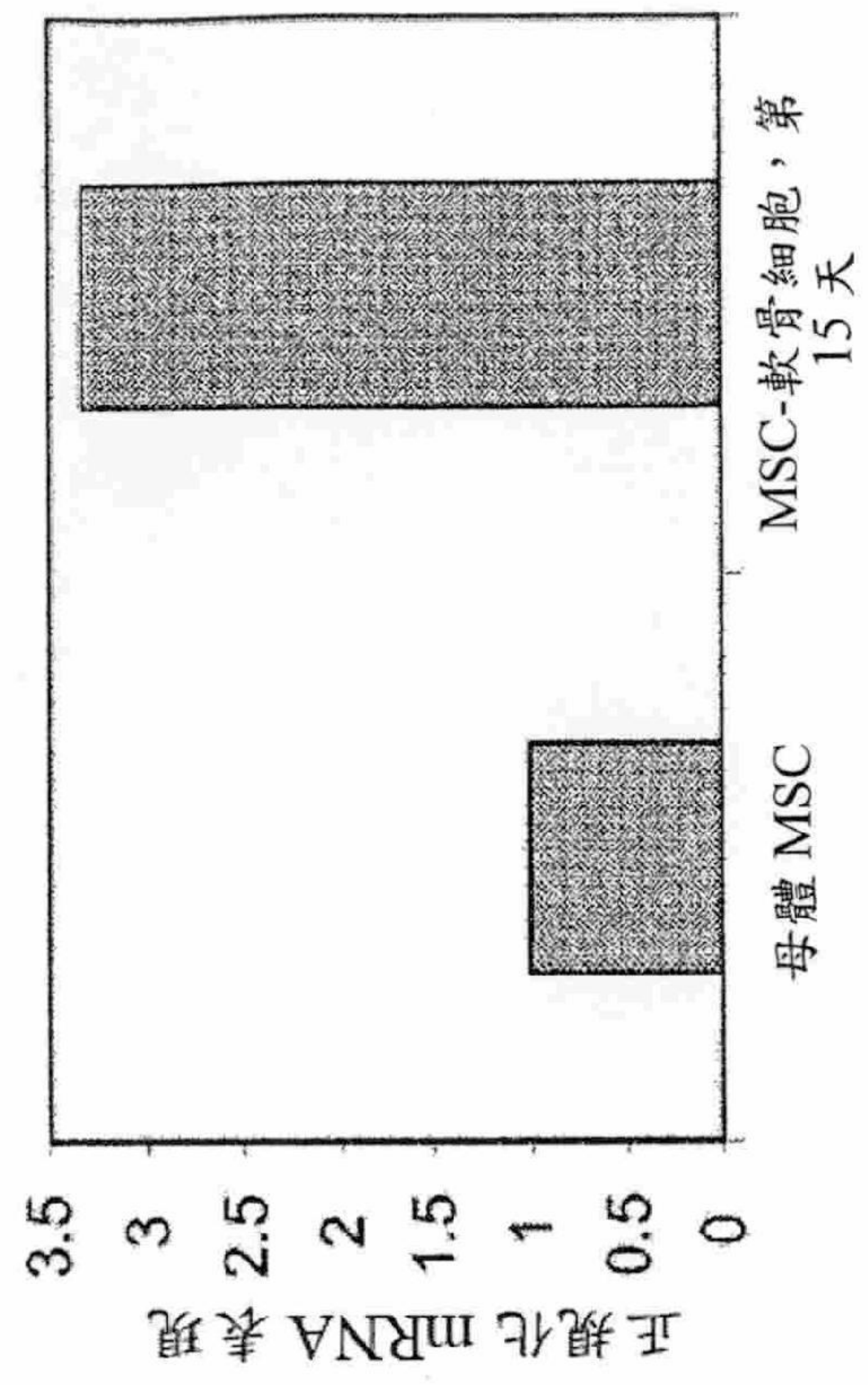


圖8

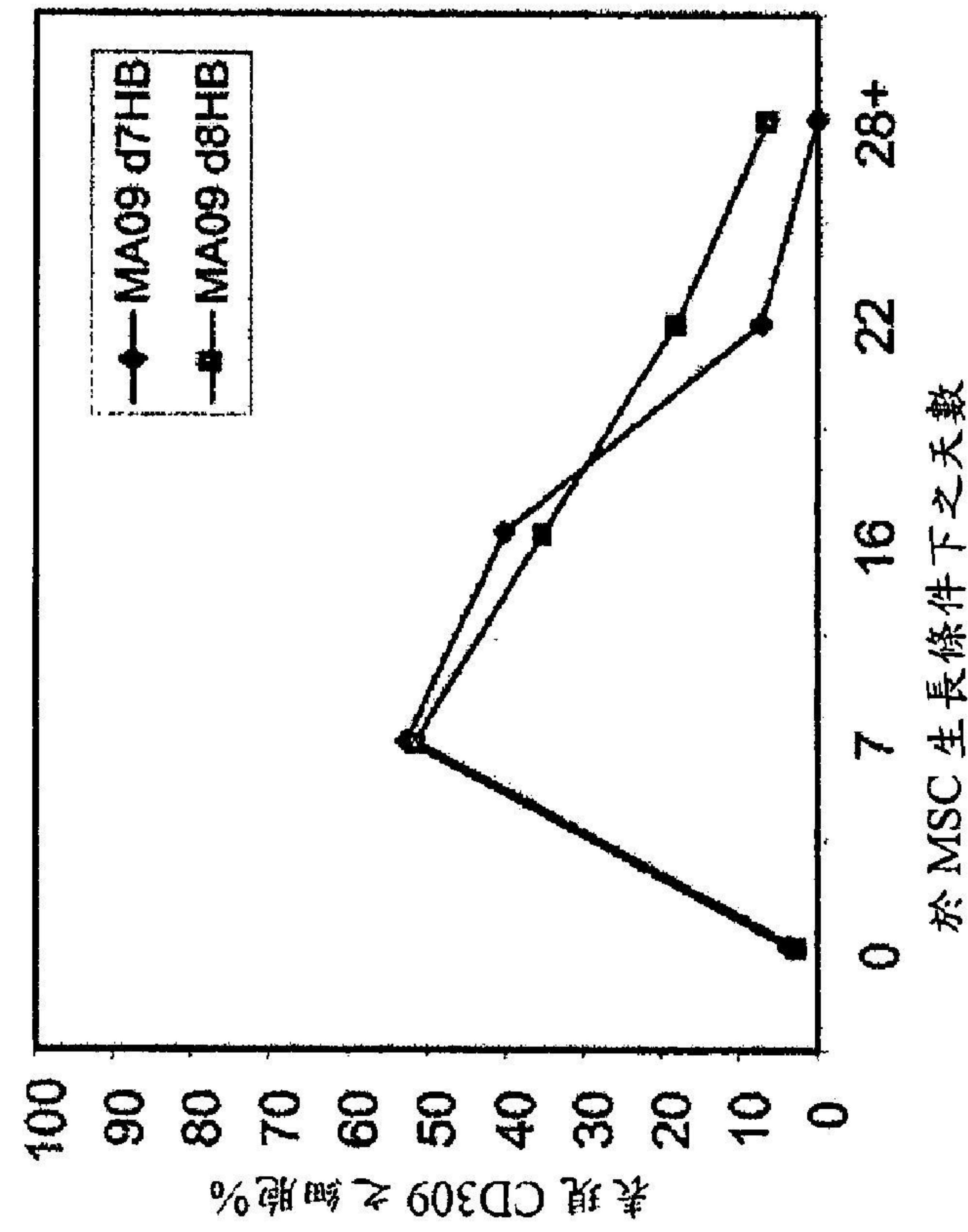


圖9

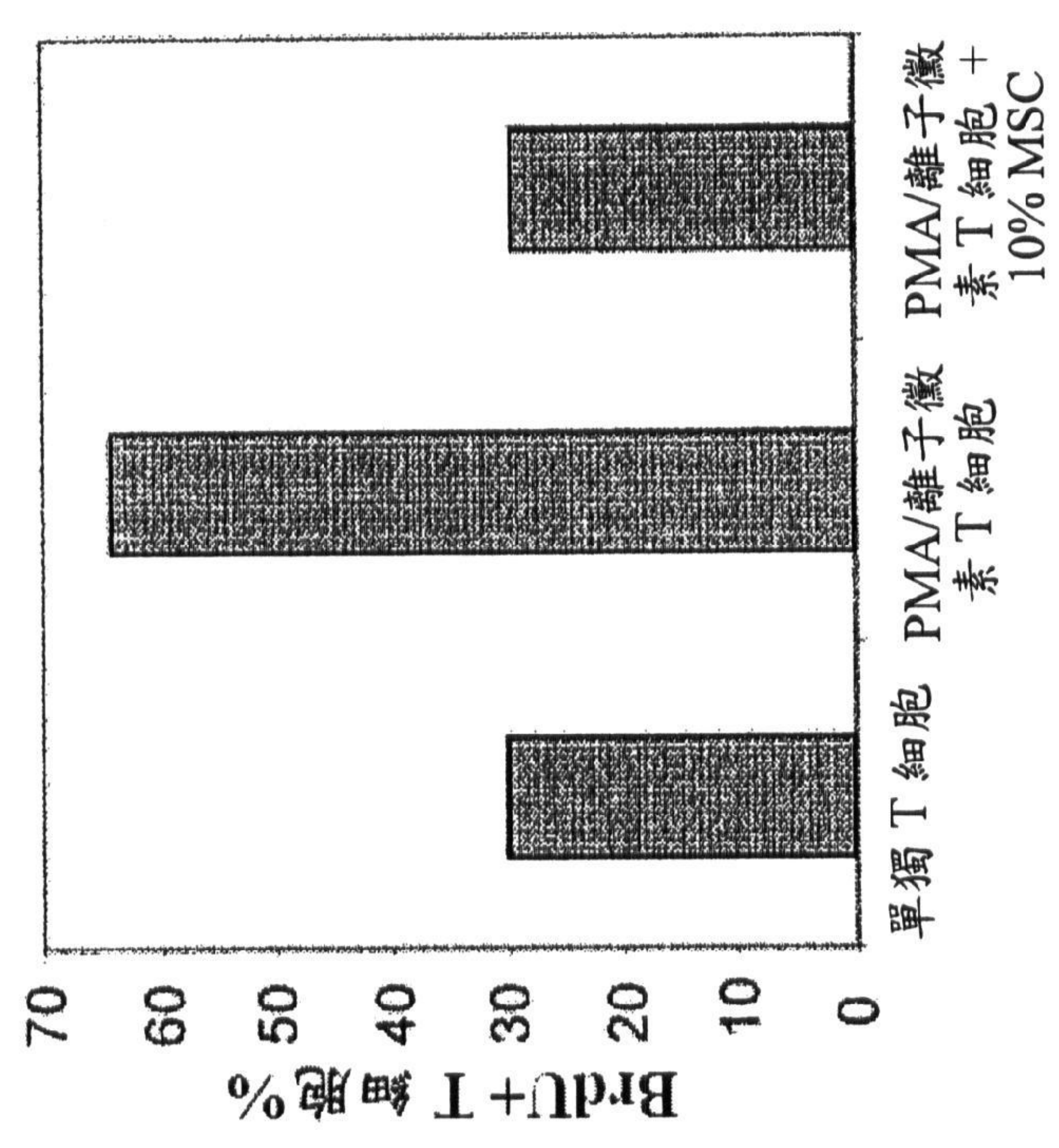


圖10A

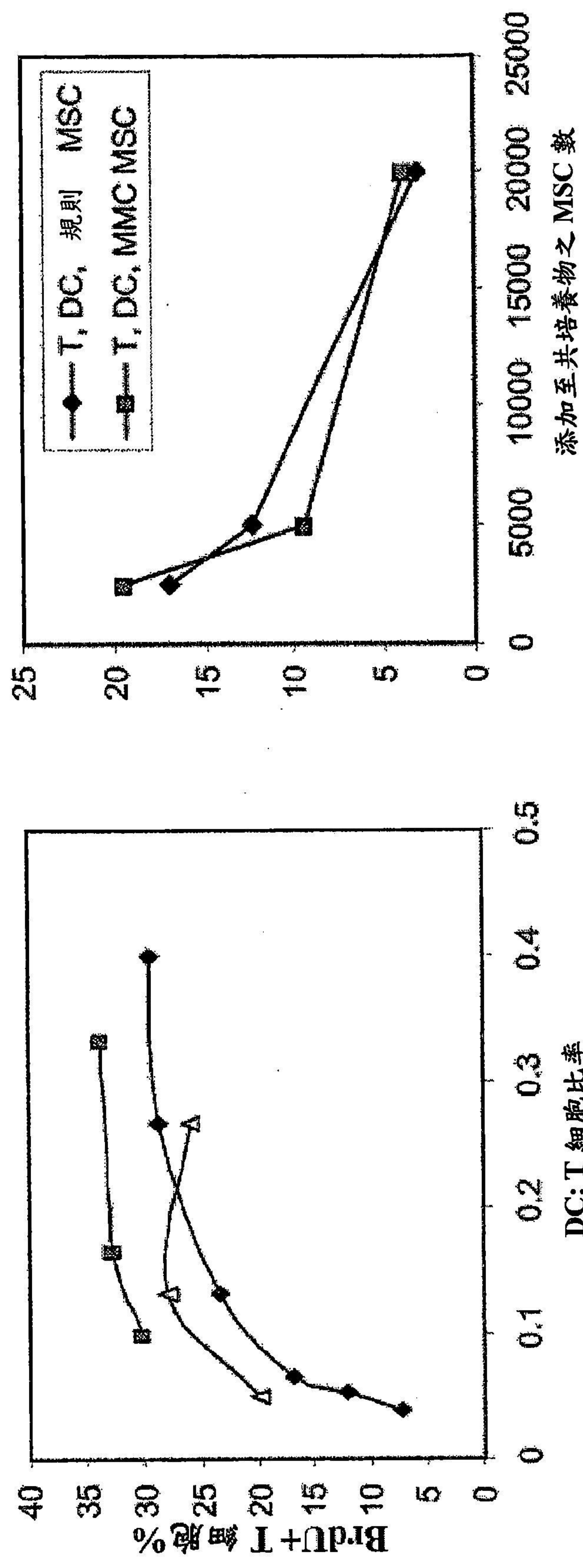


圖 10B

第 101145218 號專利申請案
中文圖式替換頁(105 年 12 月 8 日)

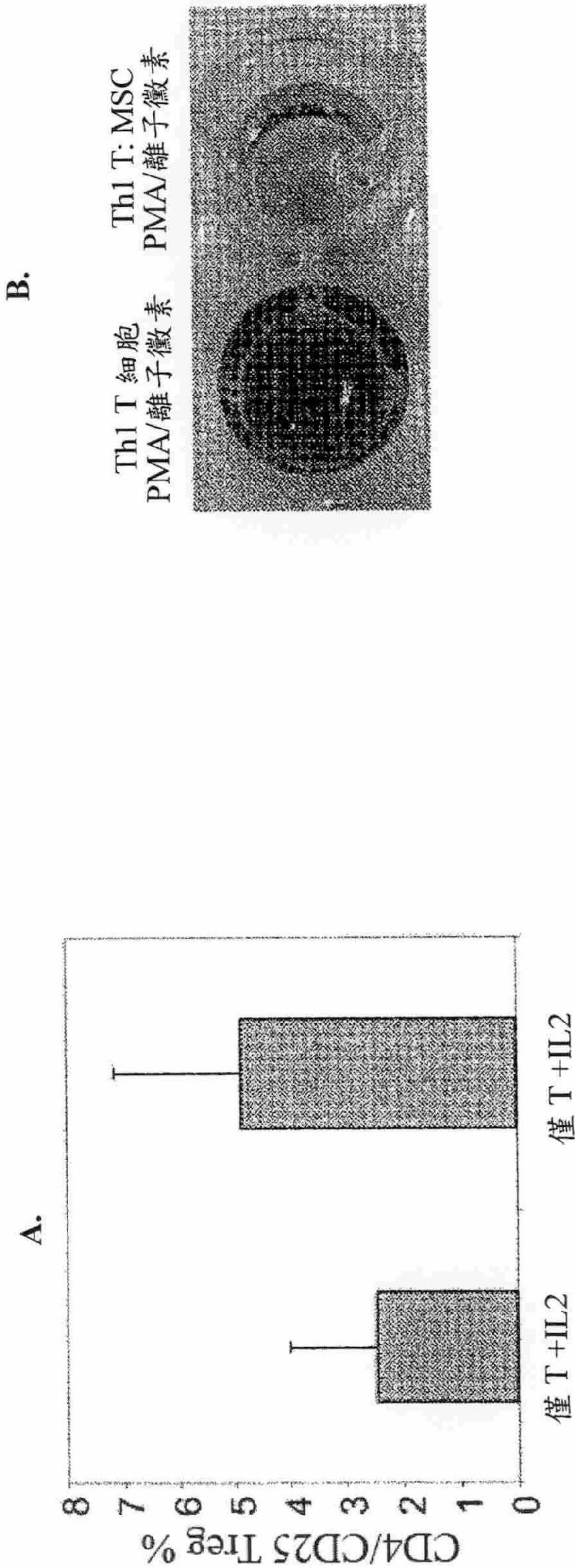


圖11

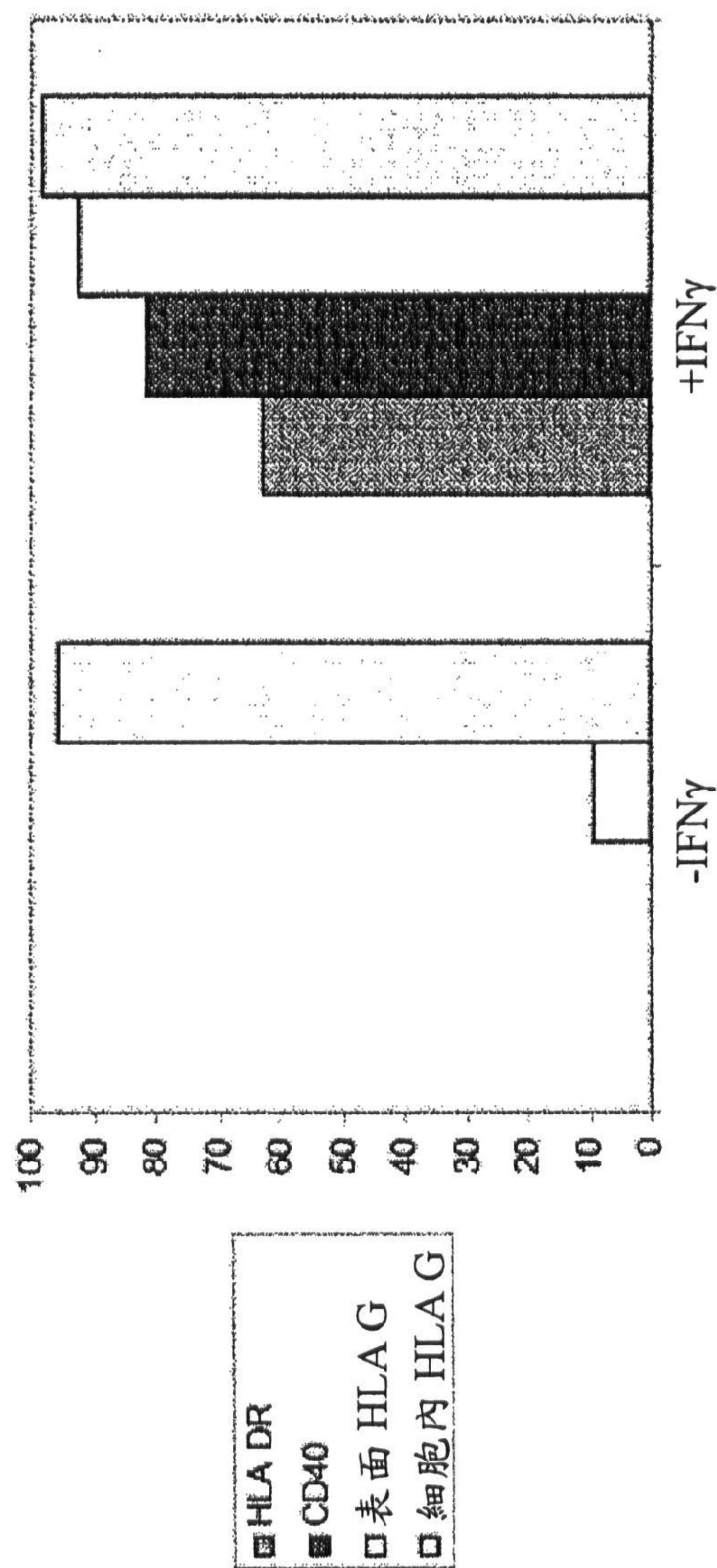


圖12

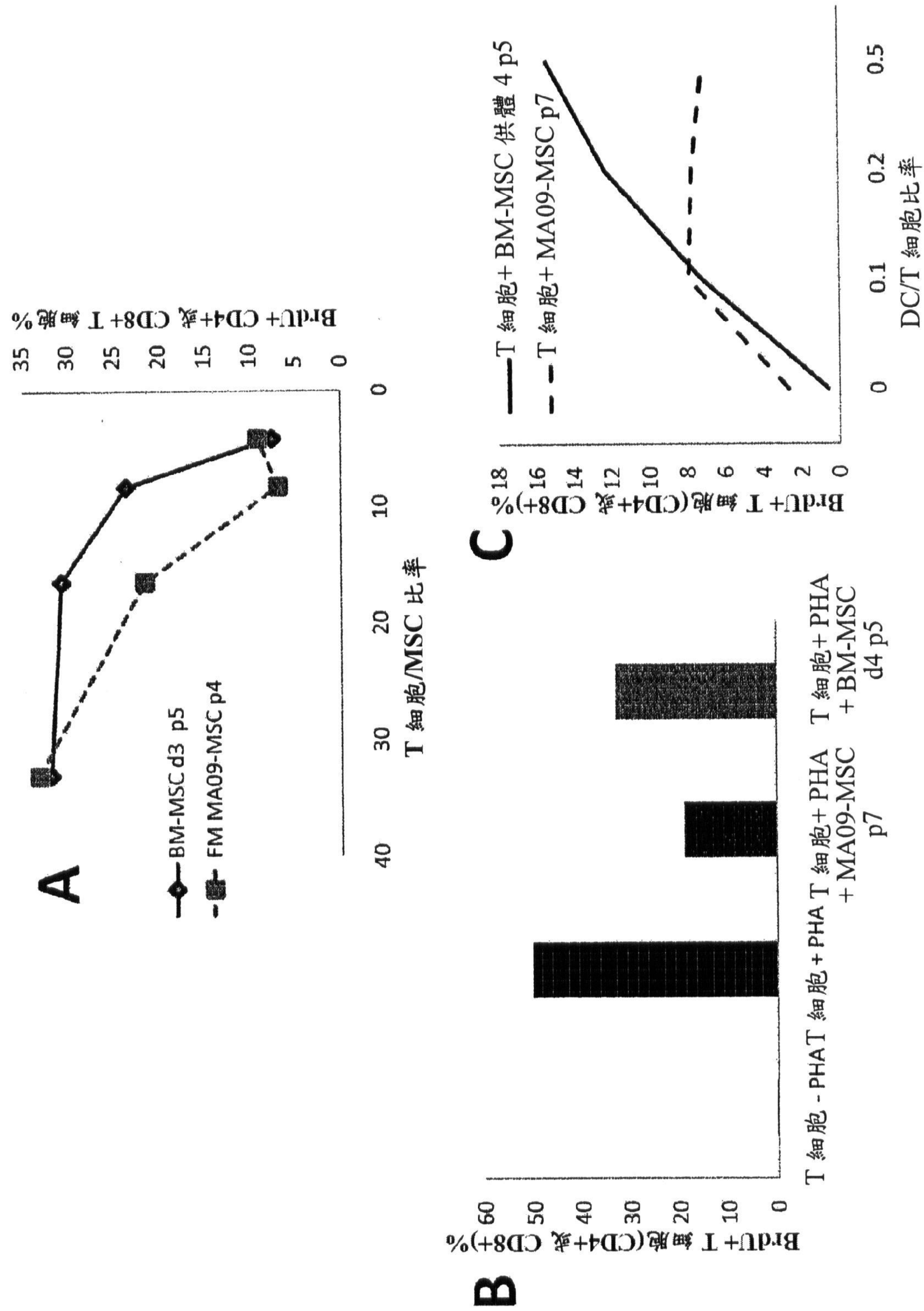


圖13

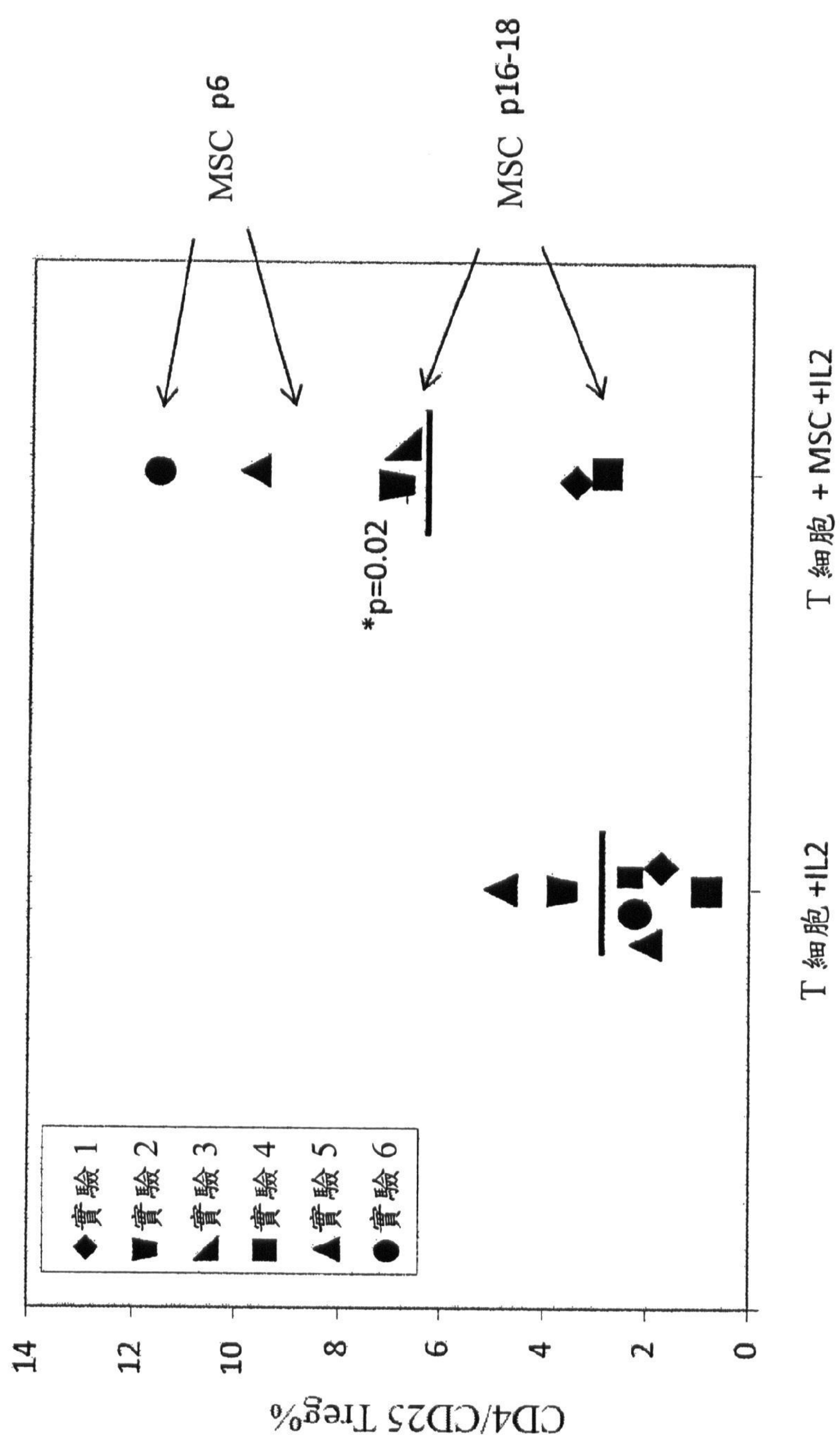


圖14

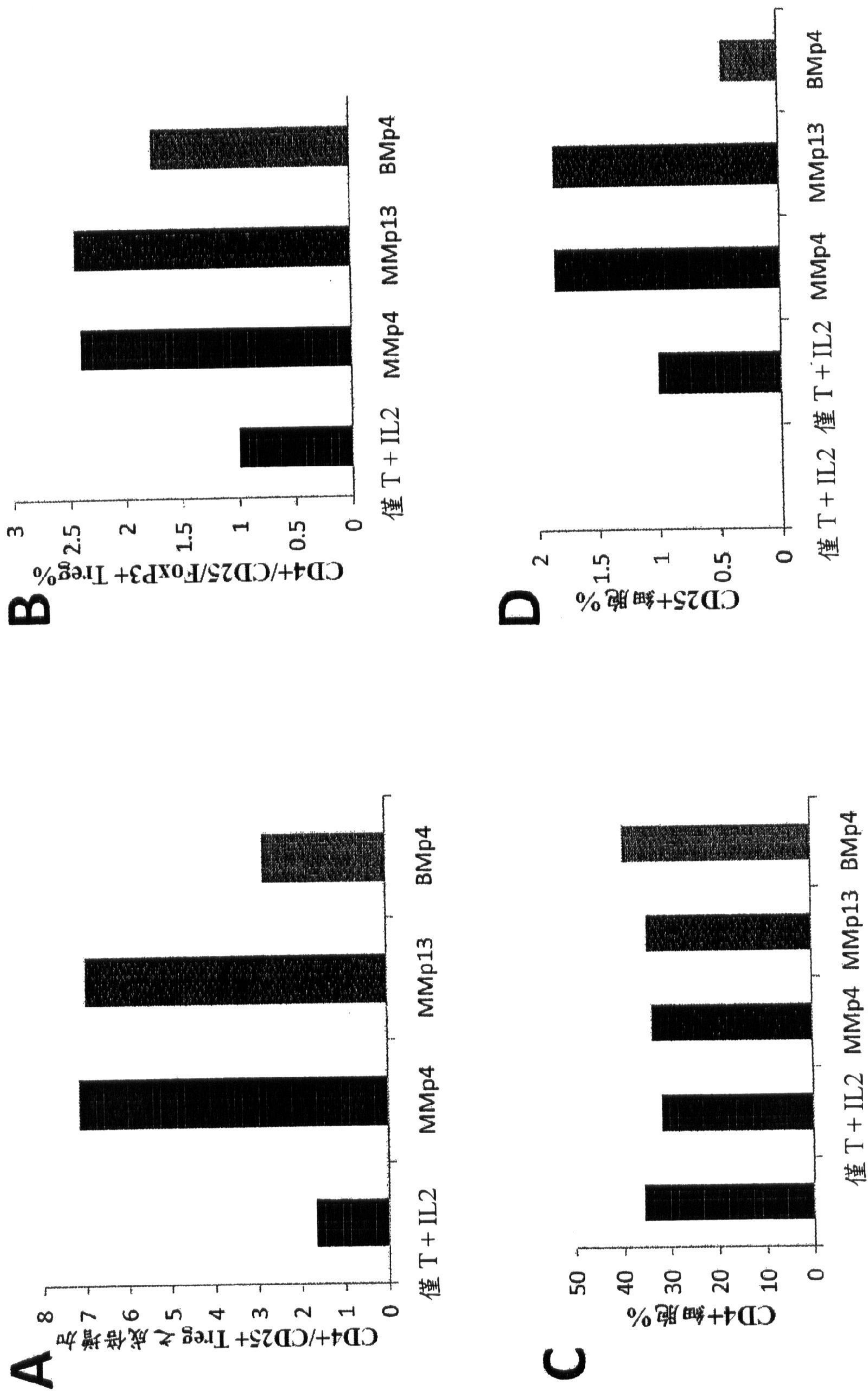


圖15

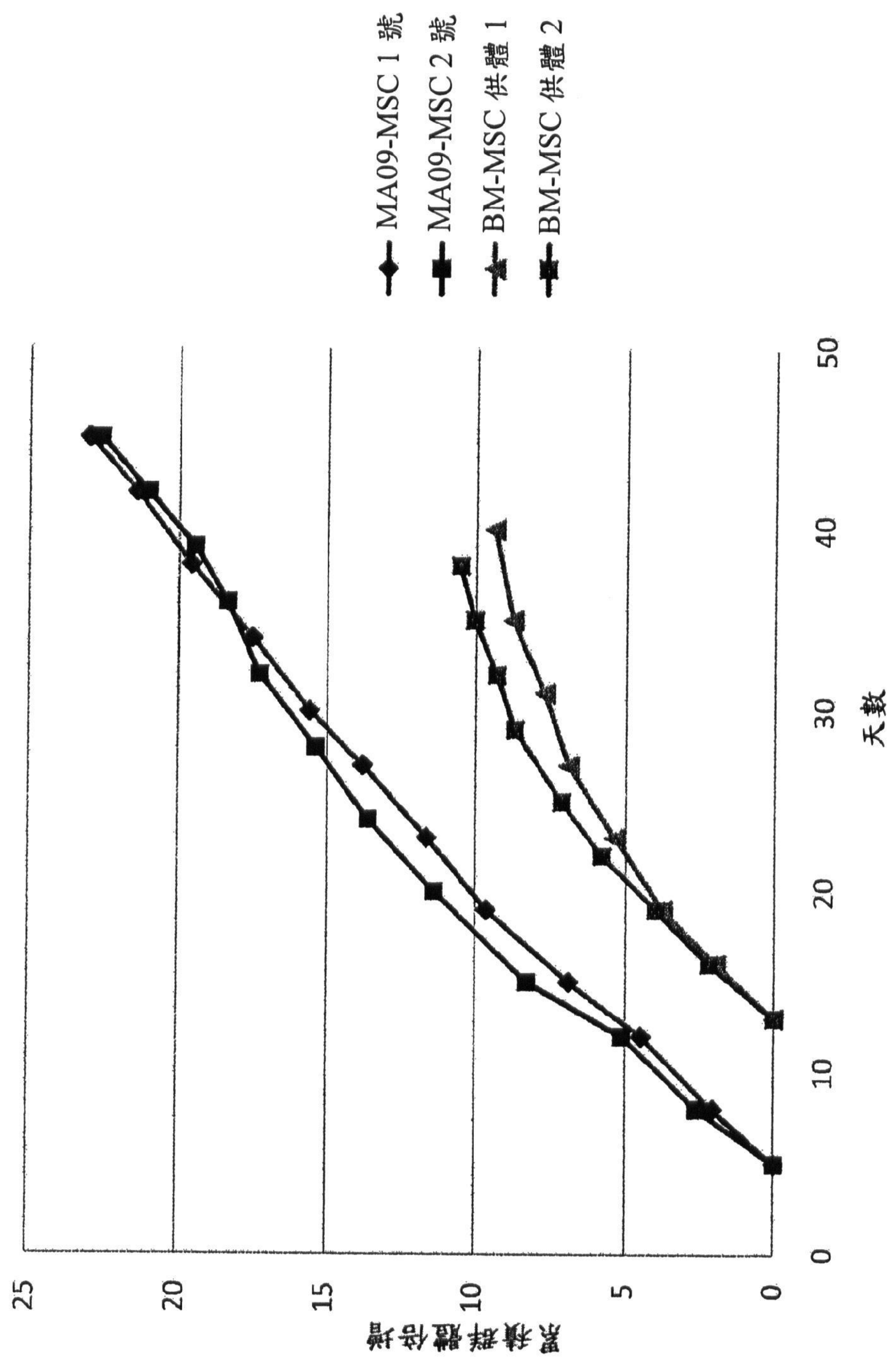
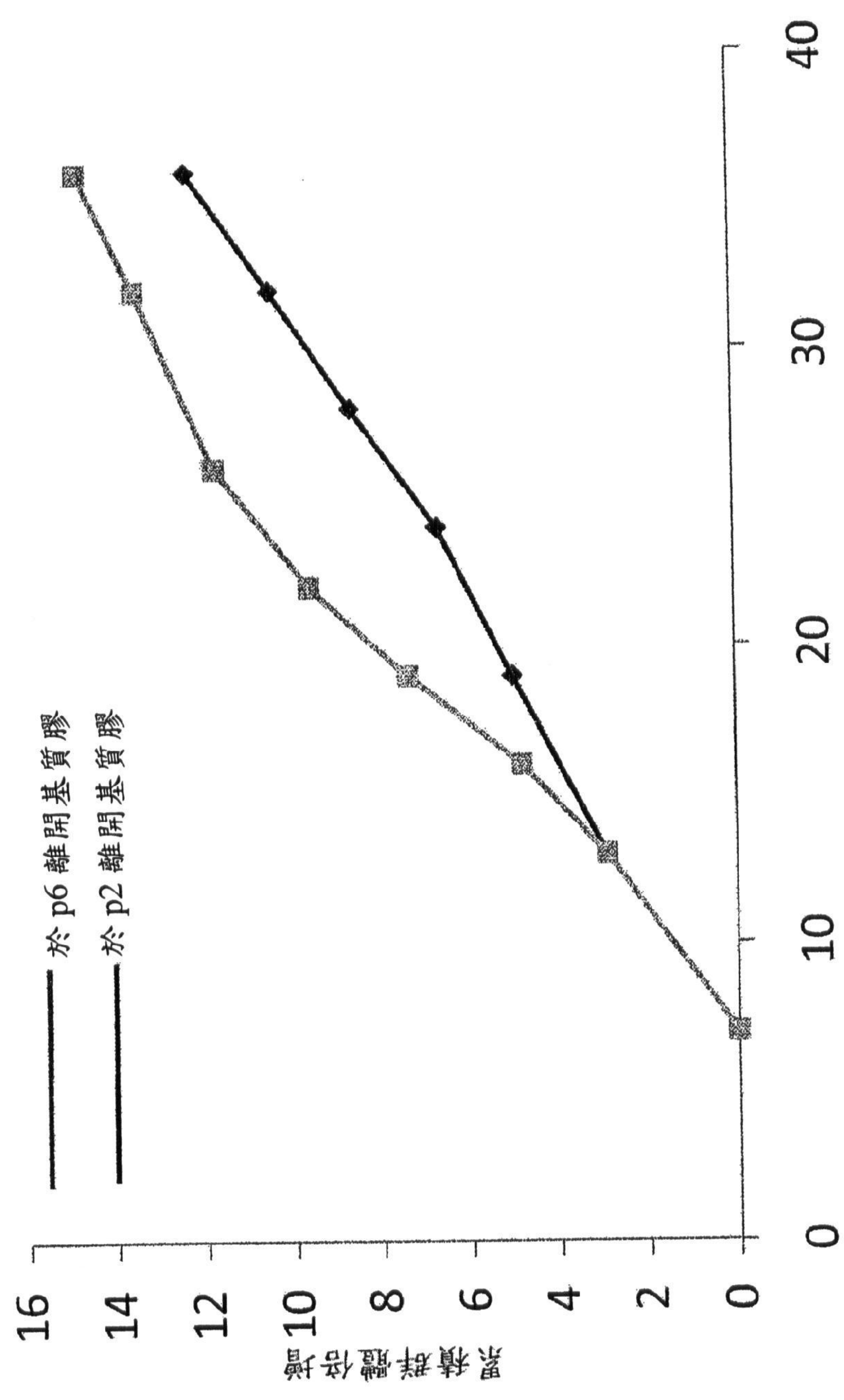


圖16



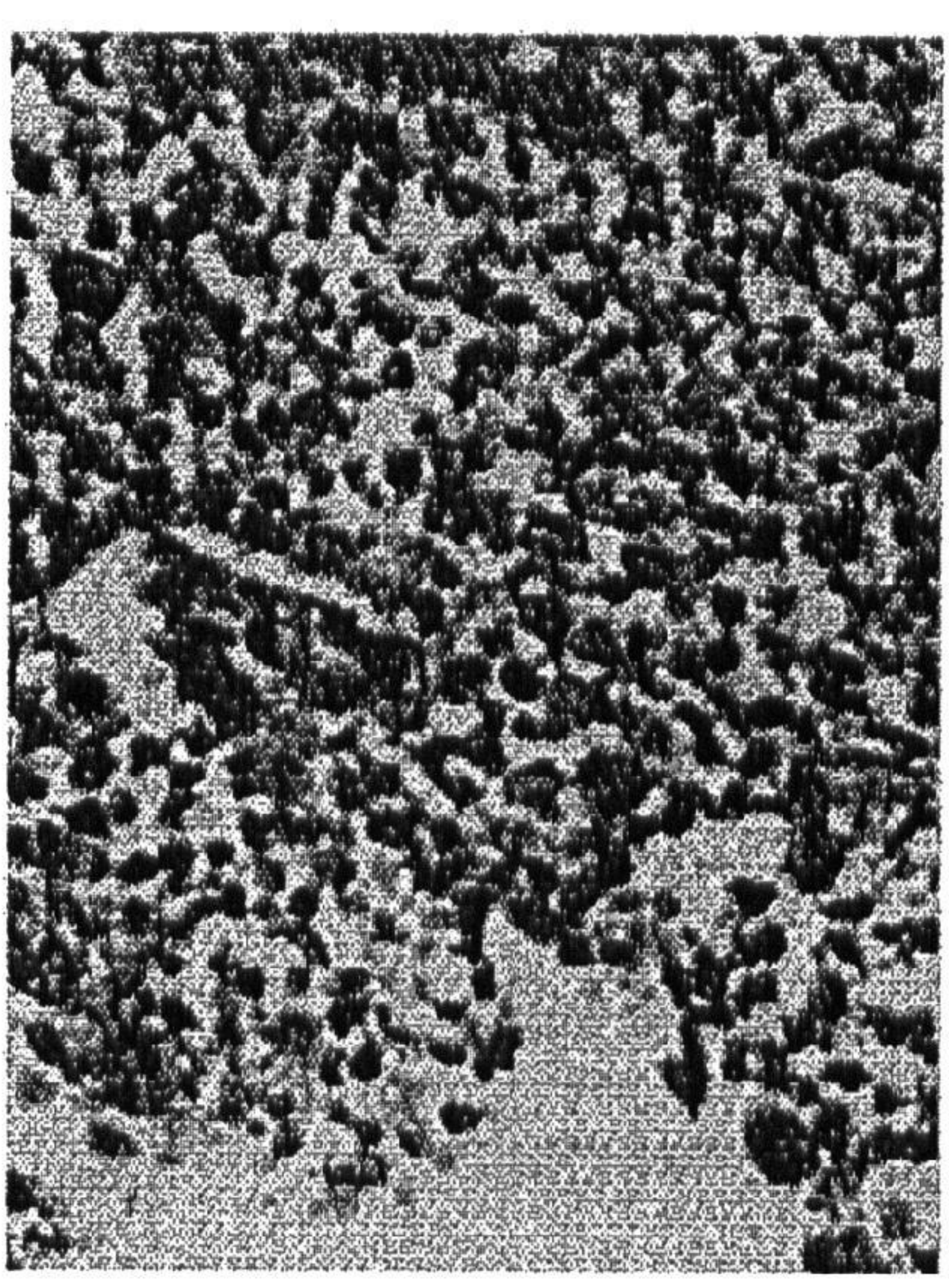
在 MSC 培養基中之天數

圖17

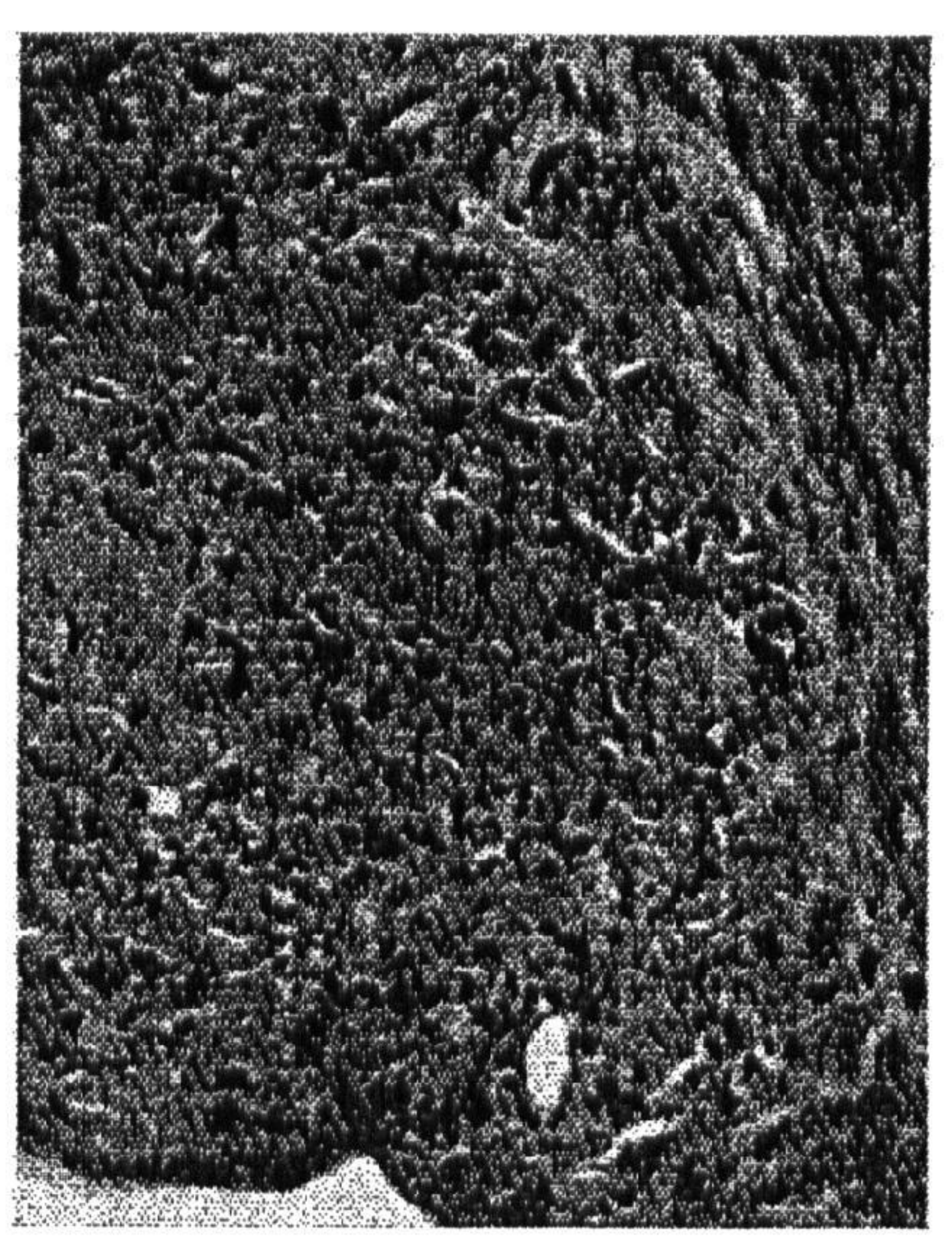
FM-MA09-MSC



BM-MSC



21 天對照(未
受刺激) 40×



21 天(軟骨形
成性刺激)

圖18

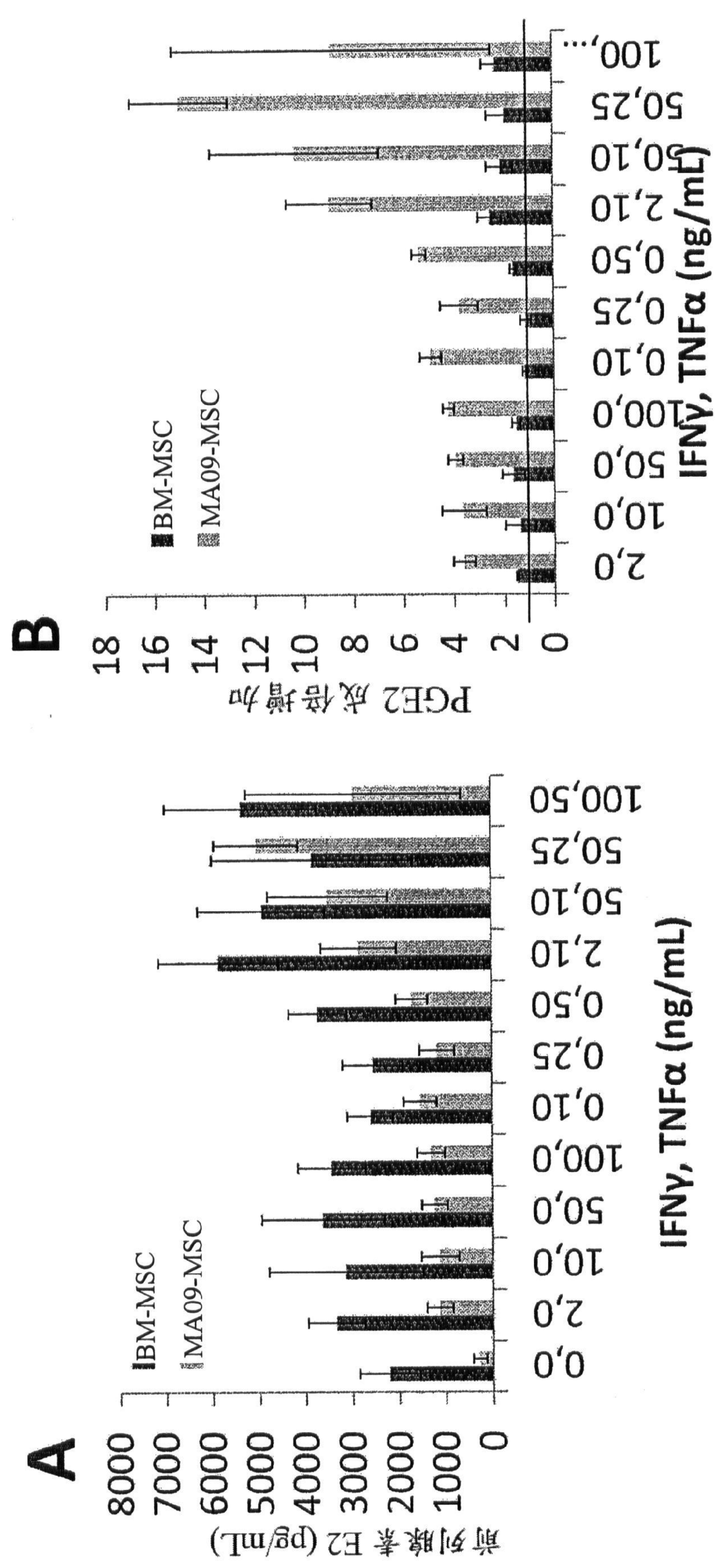


圖 19

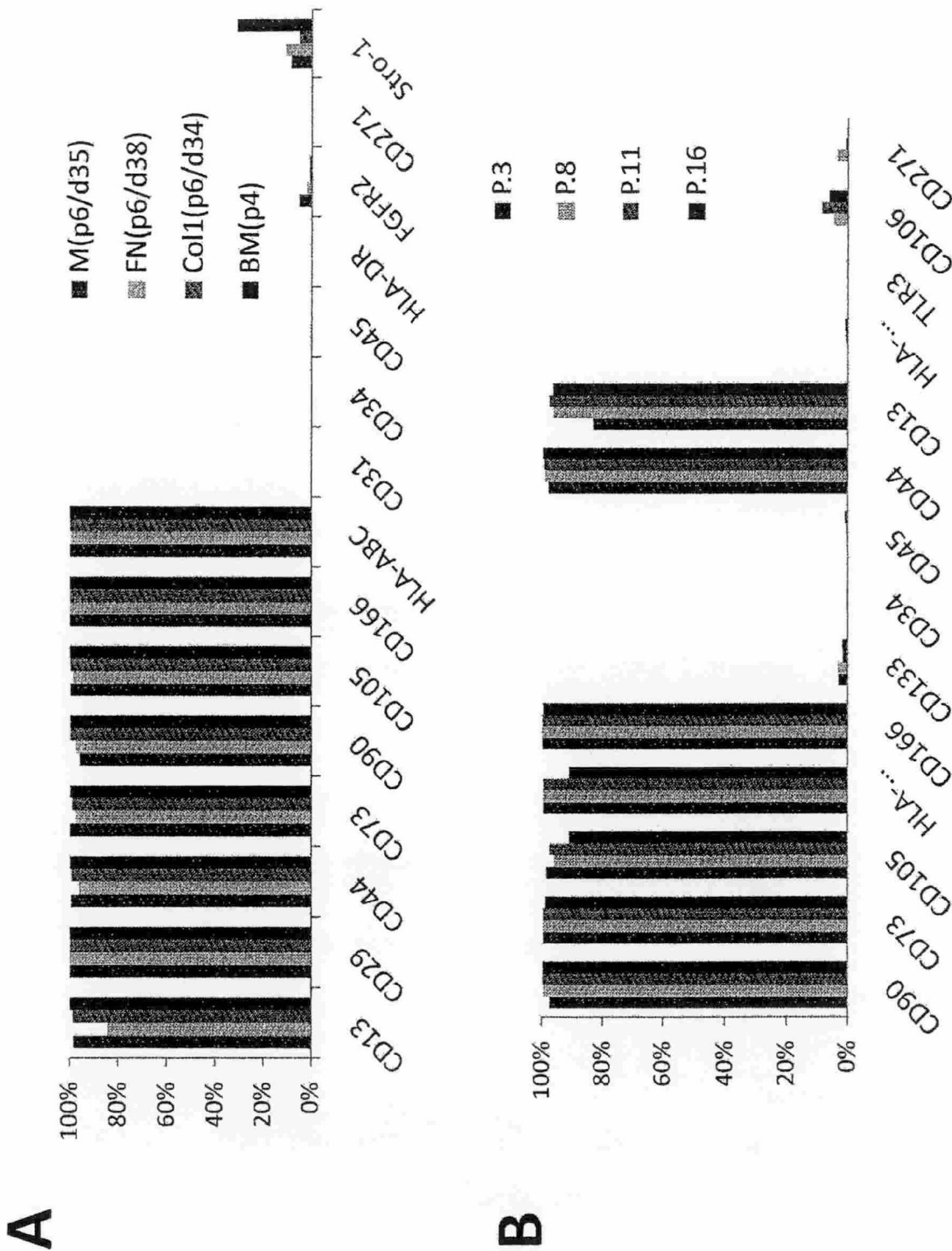


圖 20

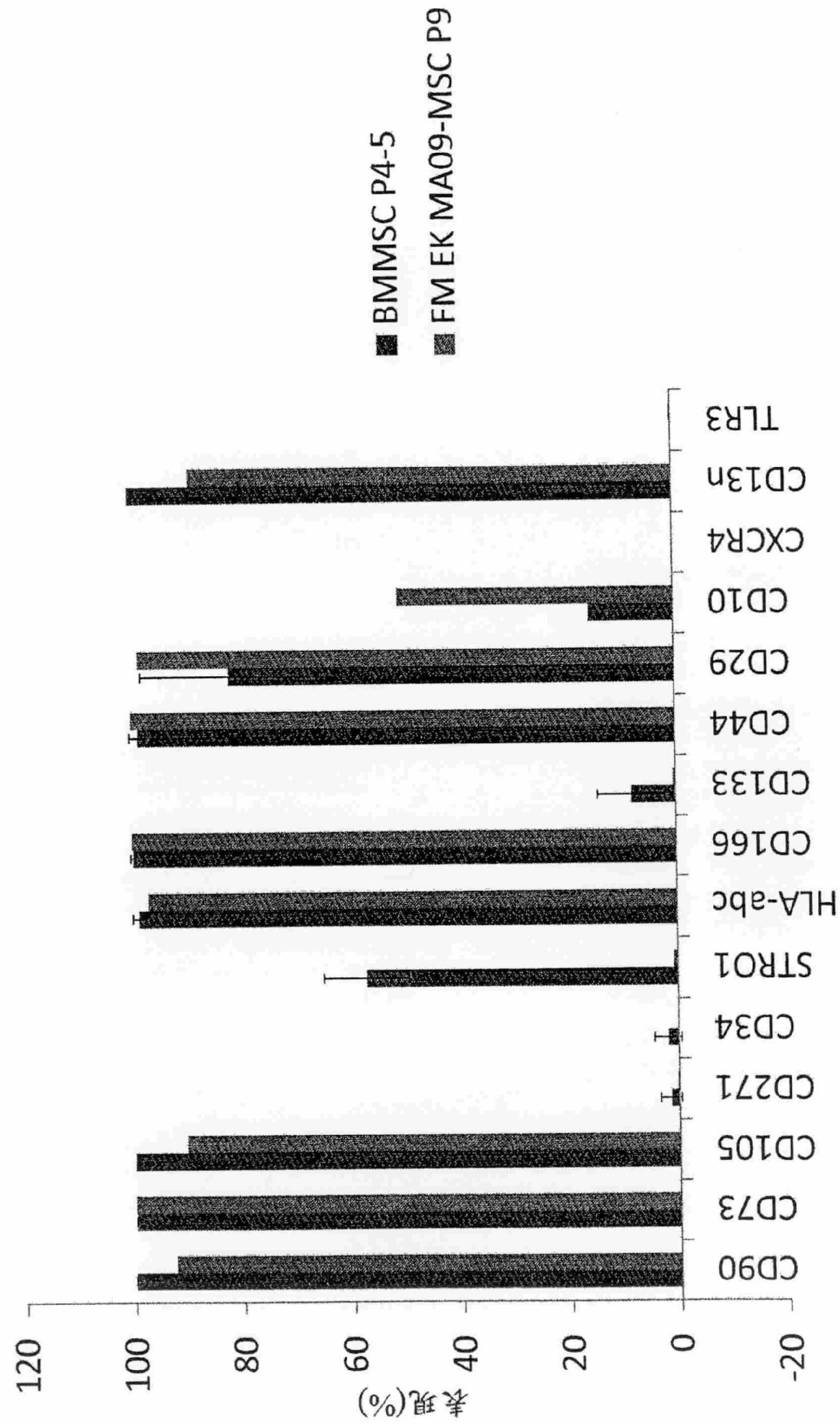


圖21

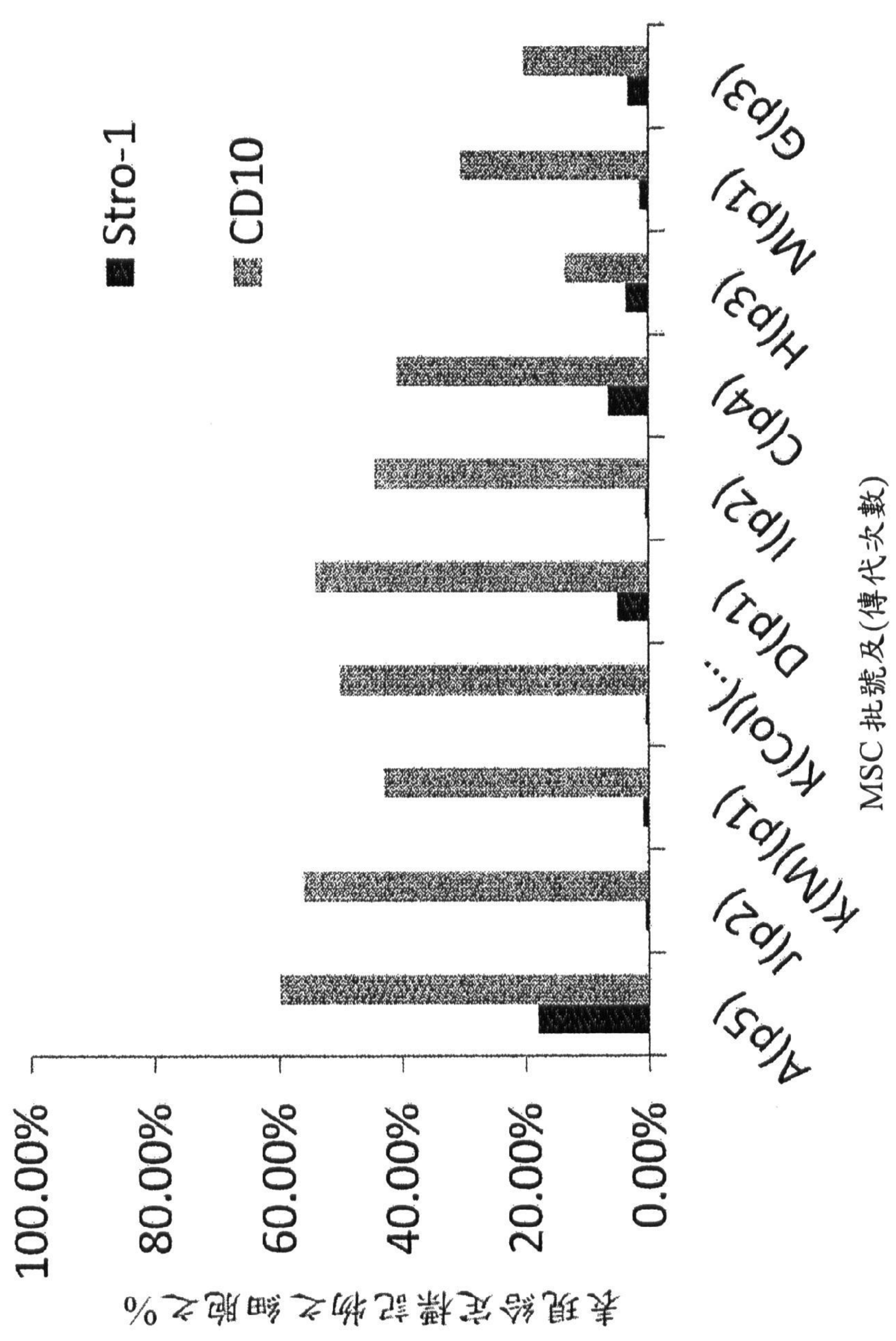


圖22

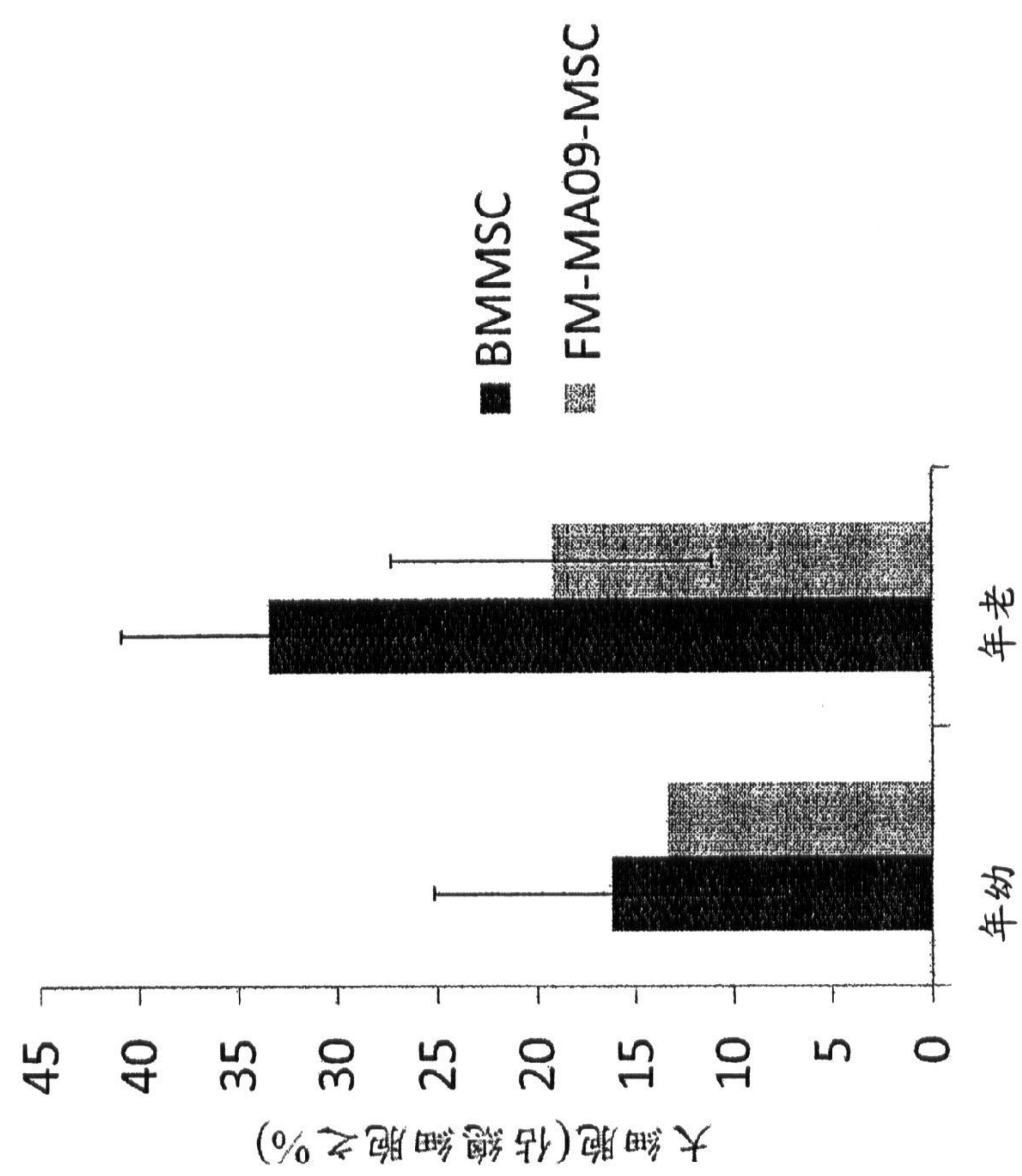
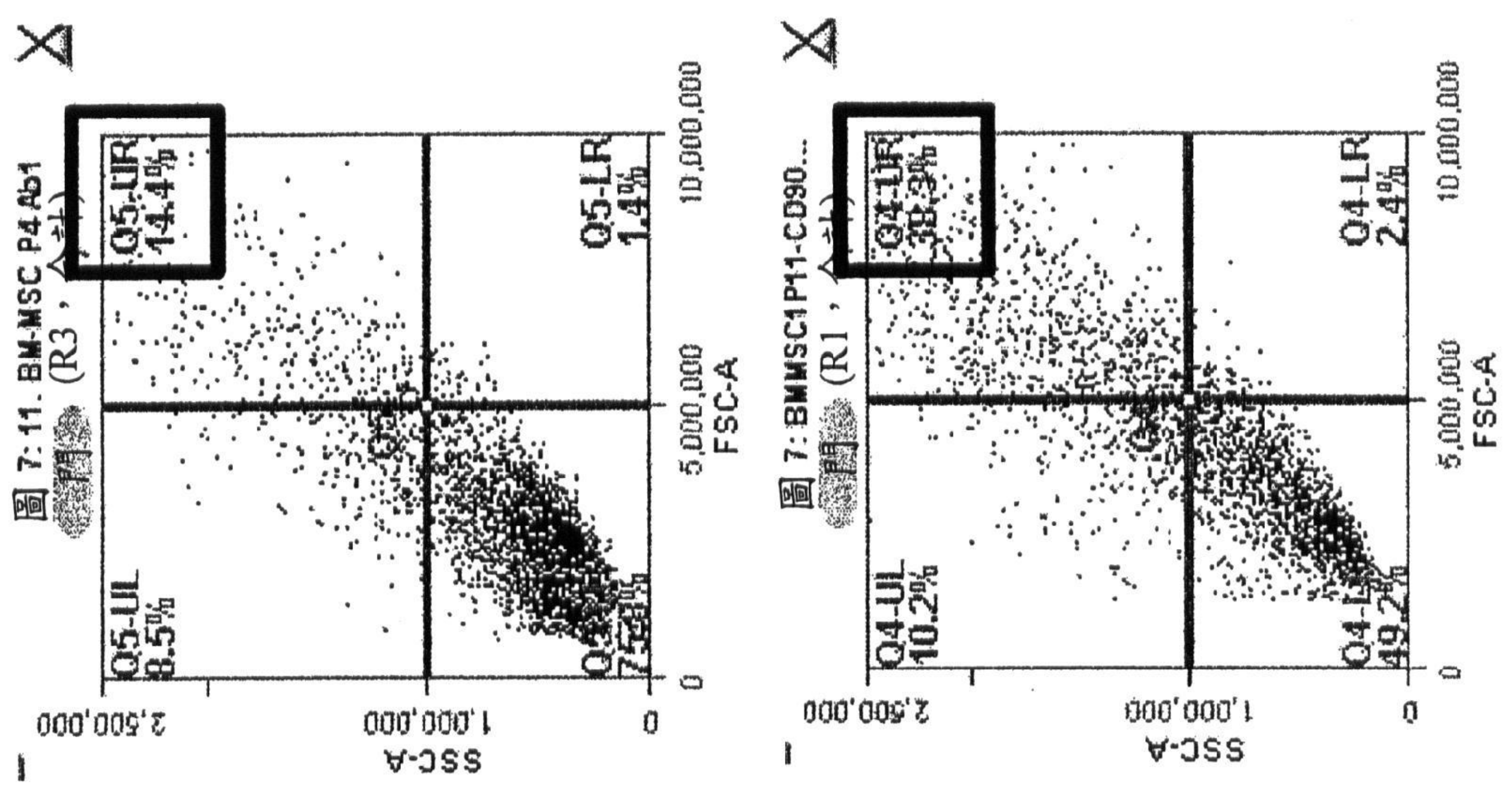


圖23

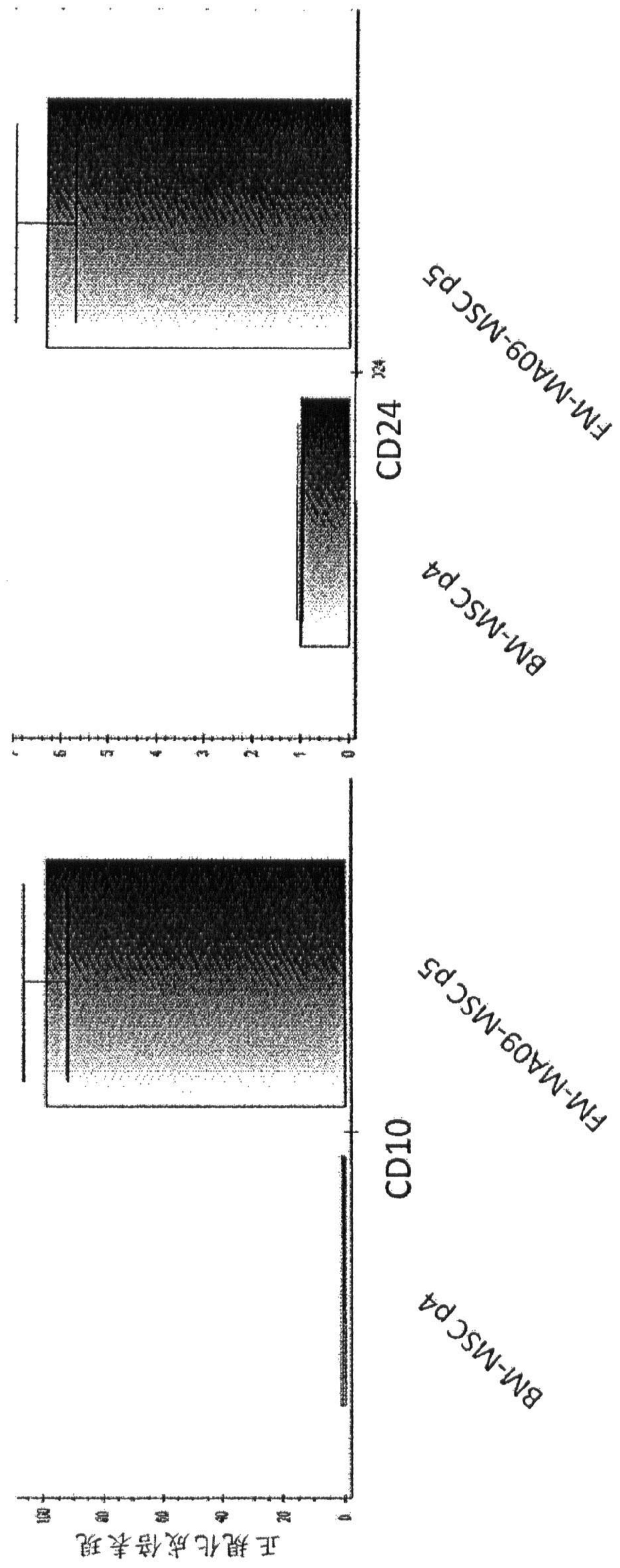


圖24

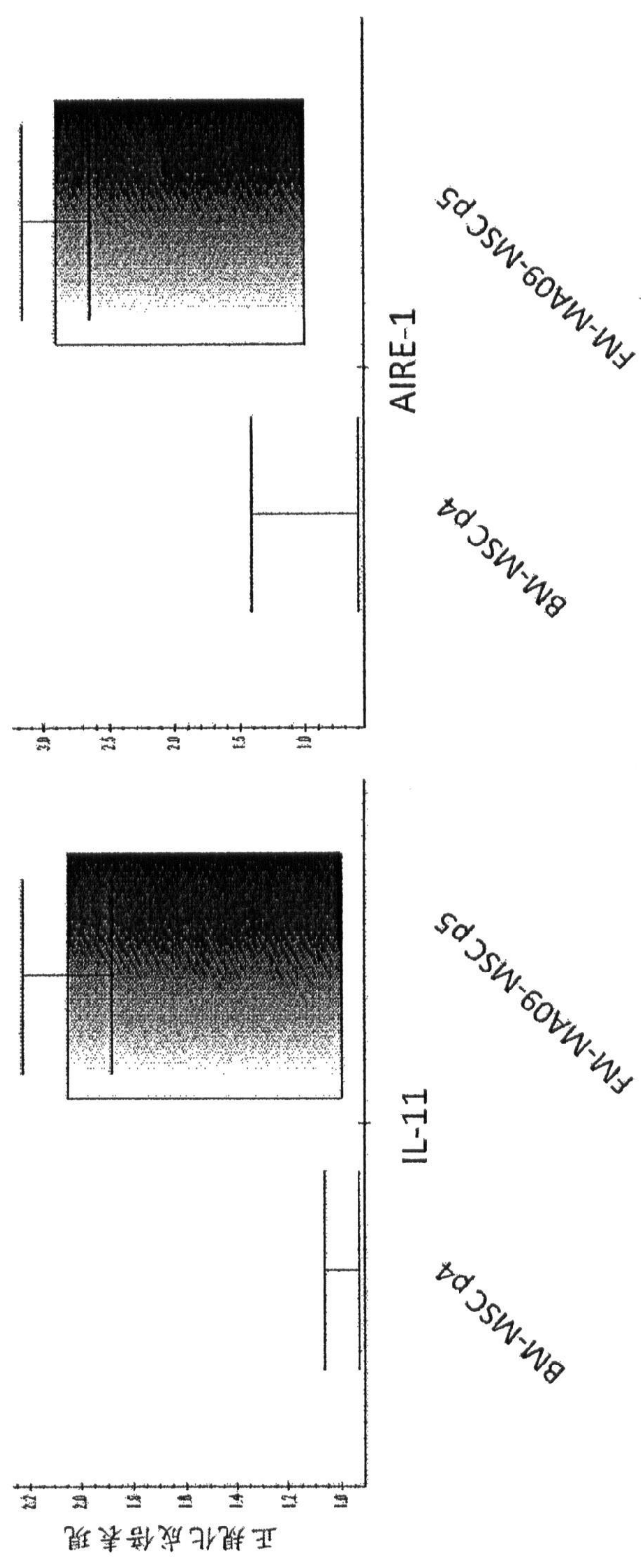


圖25

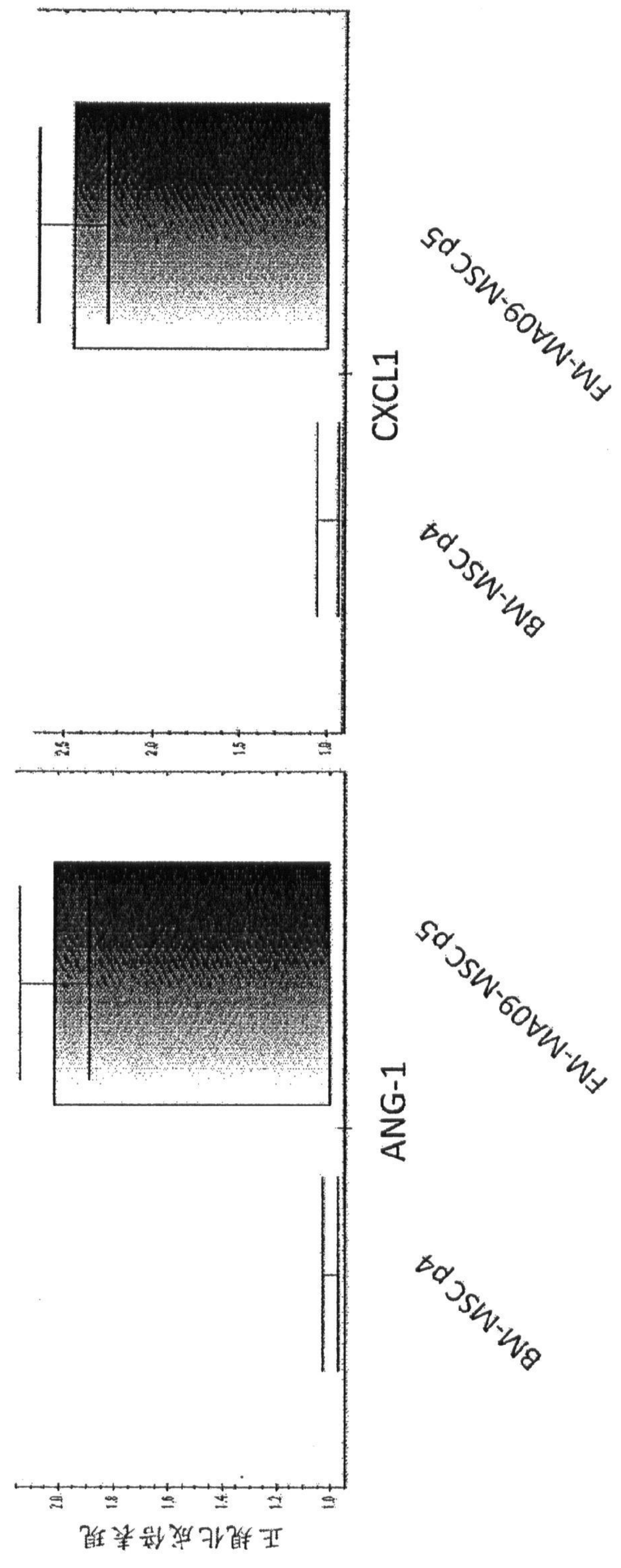


圖 26

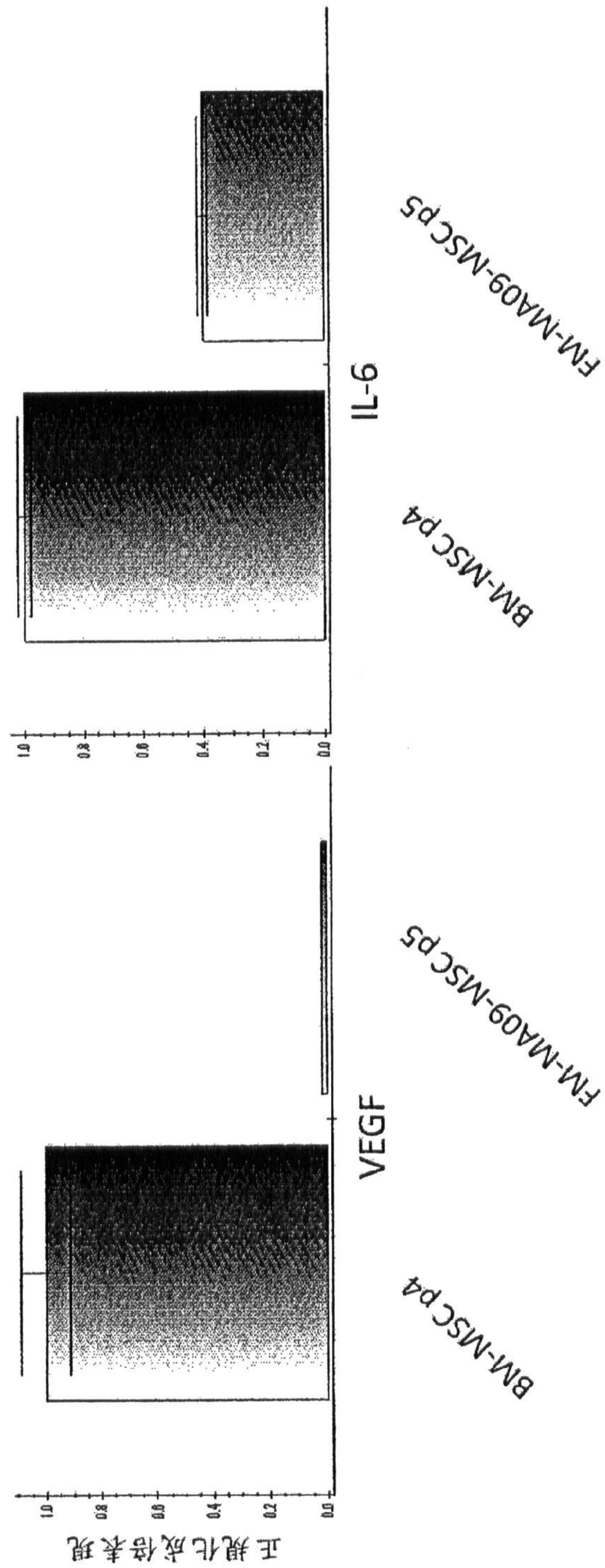


圖 27

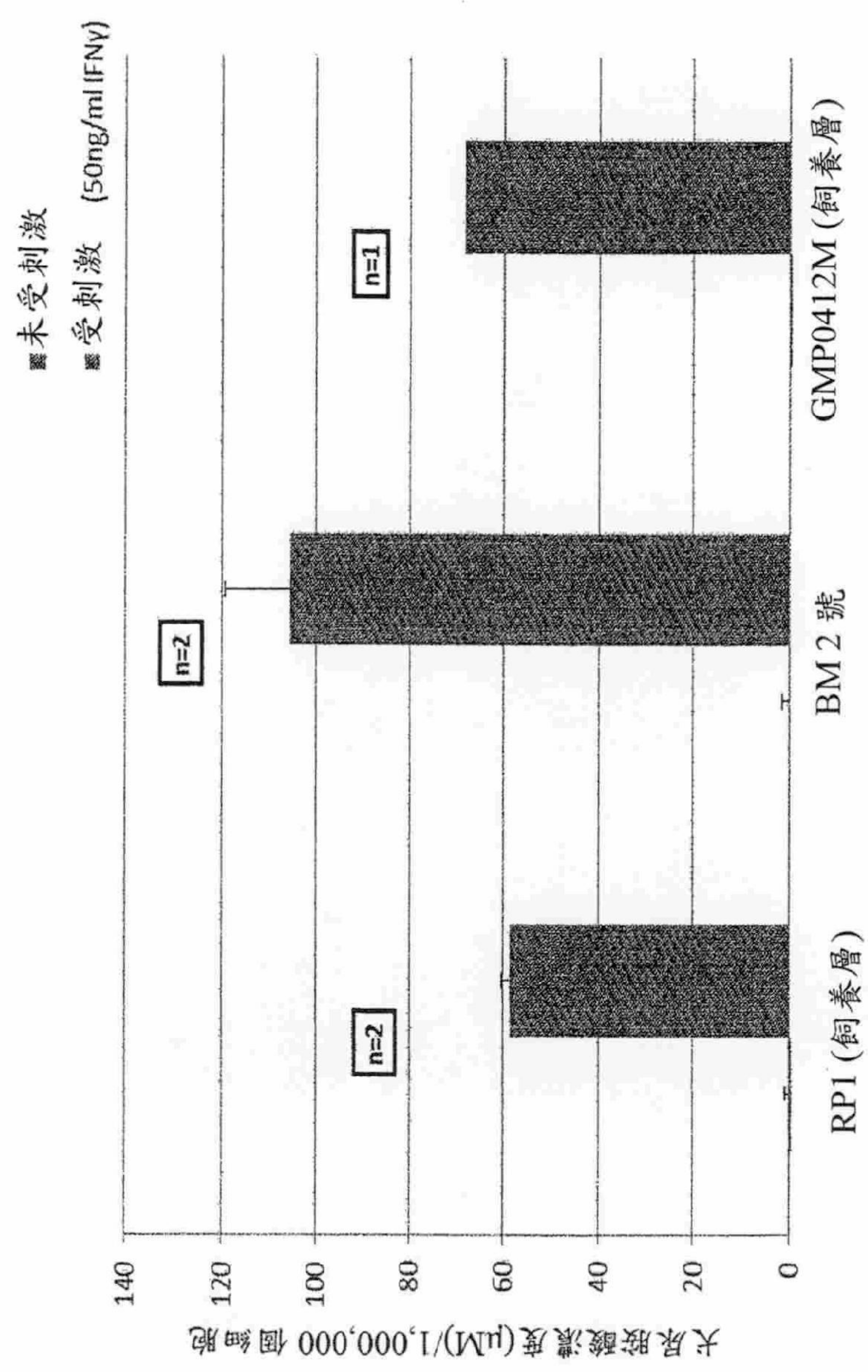


圖28

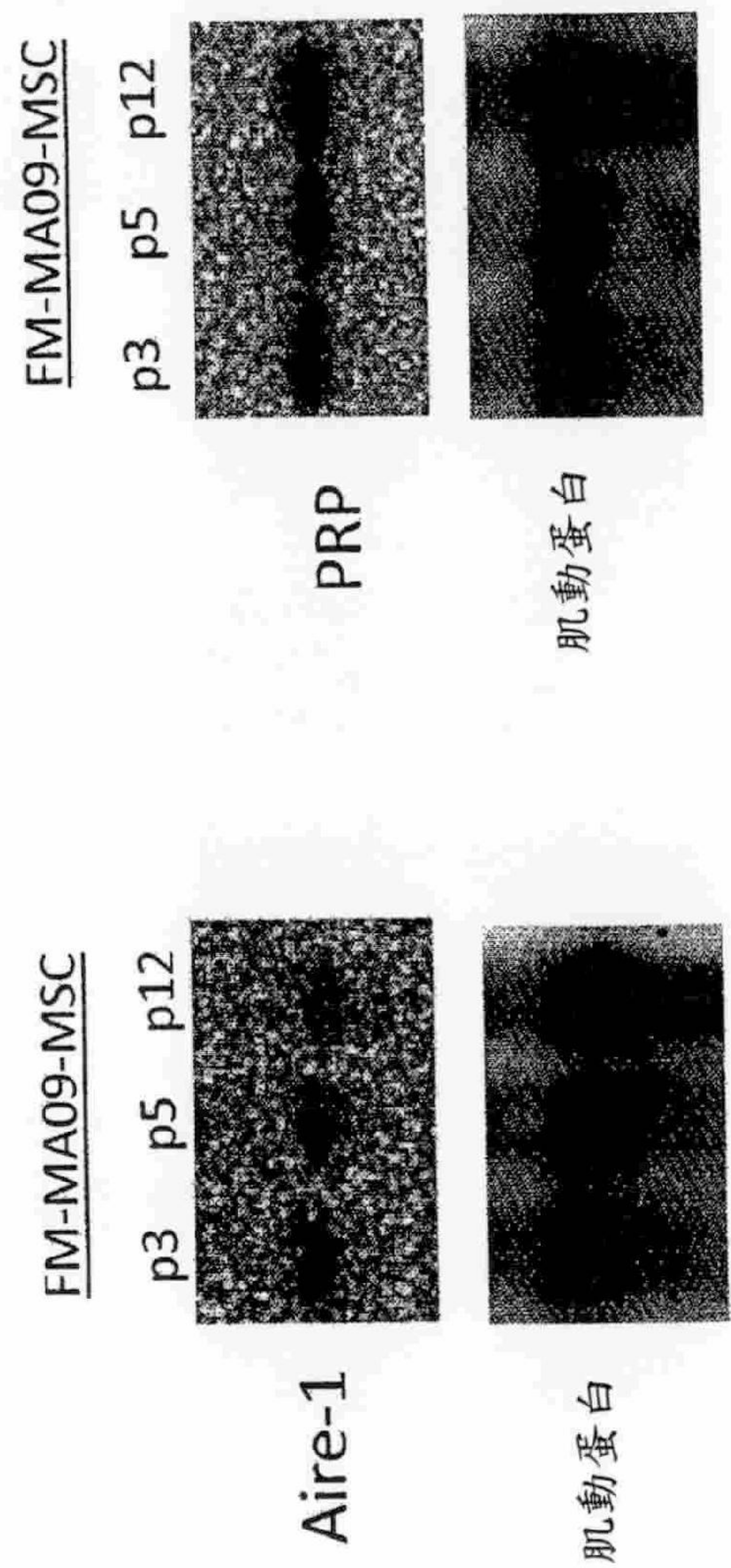


圖29

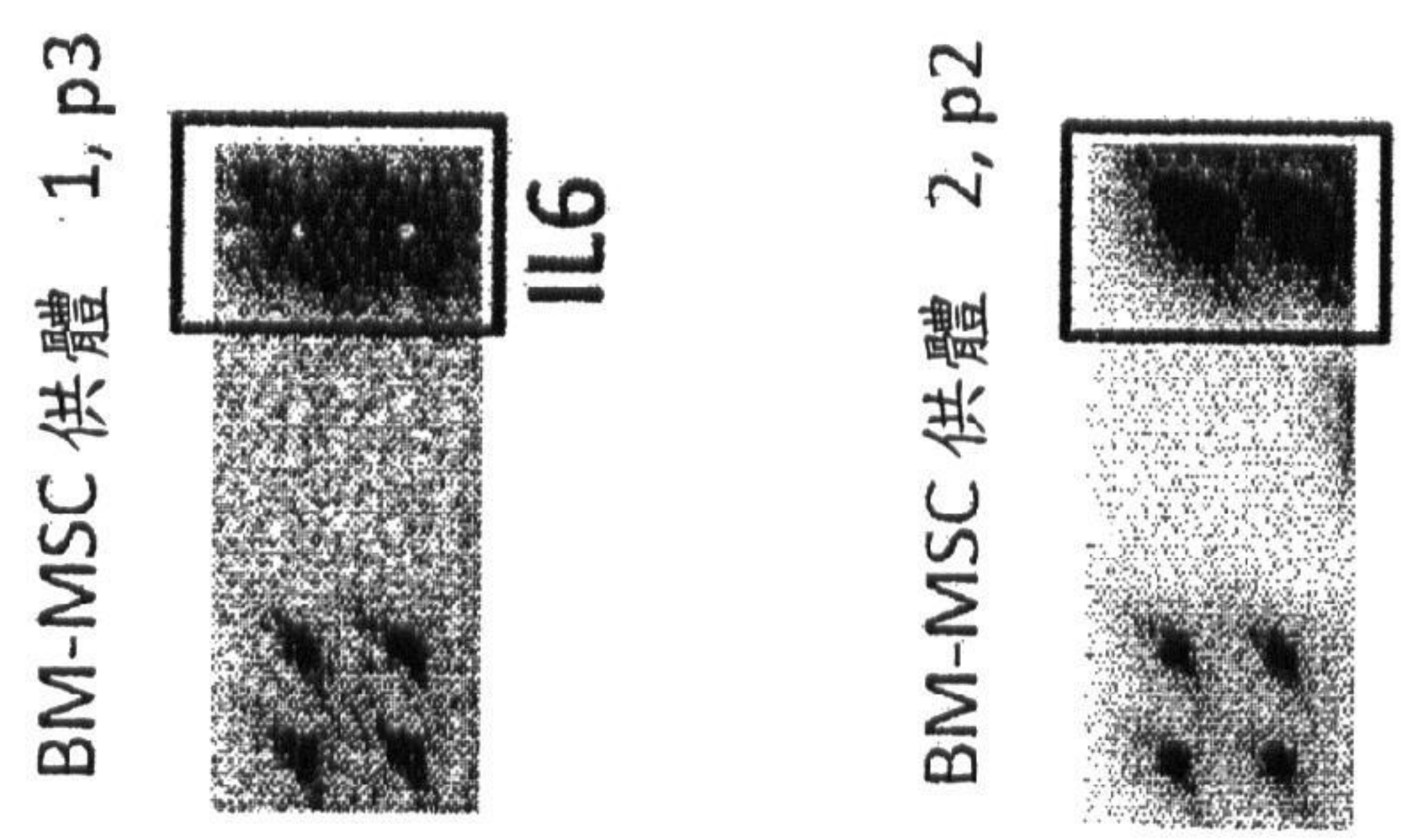
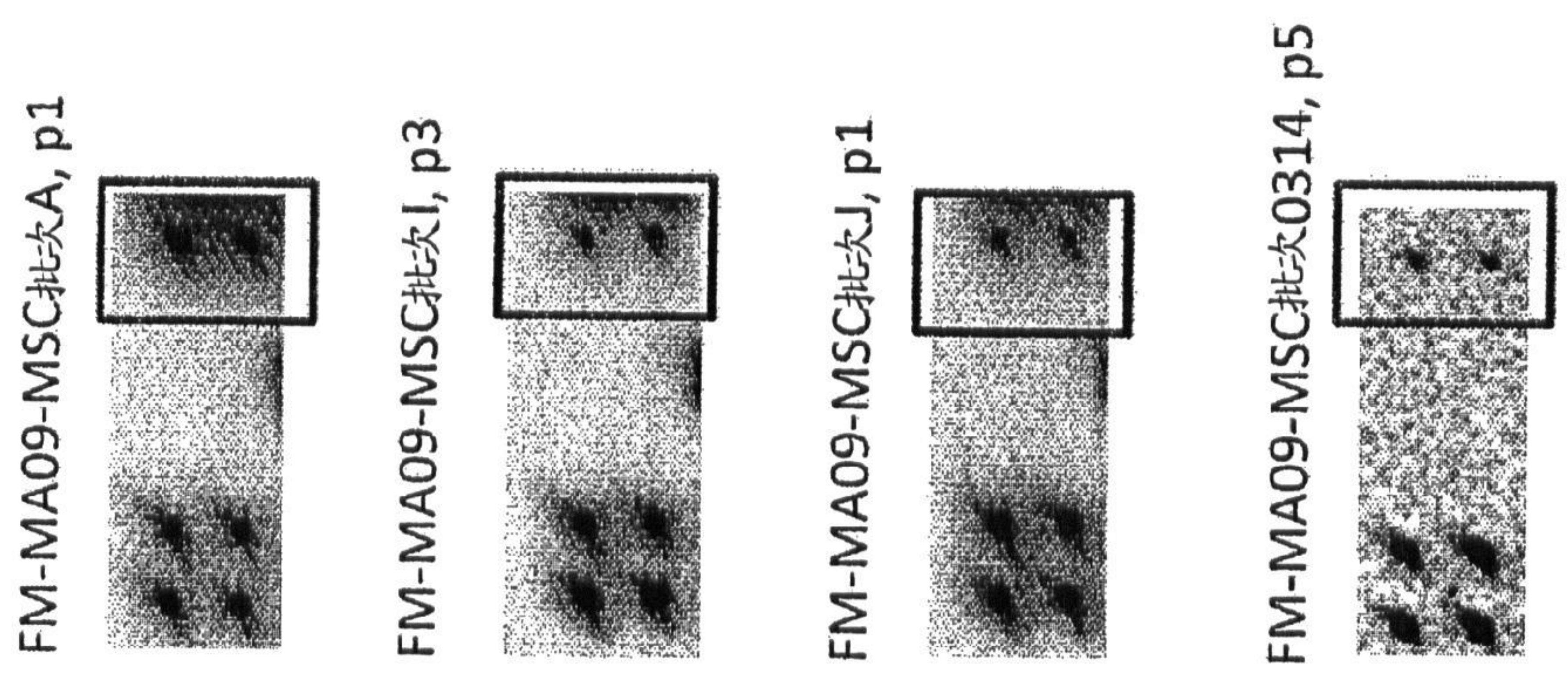


圖30

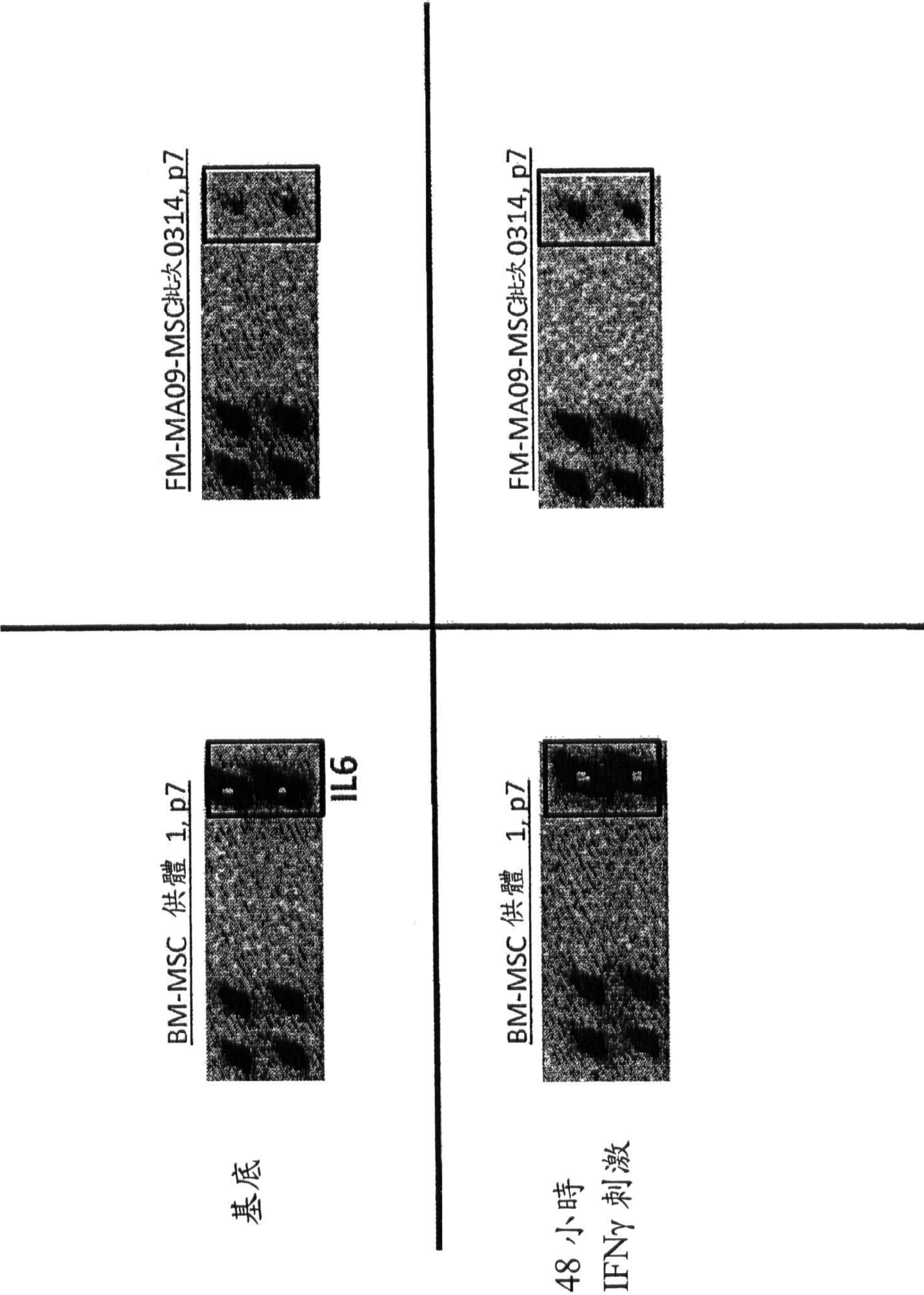


圖31

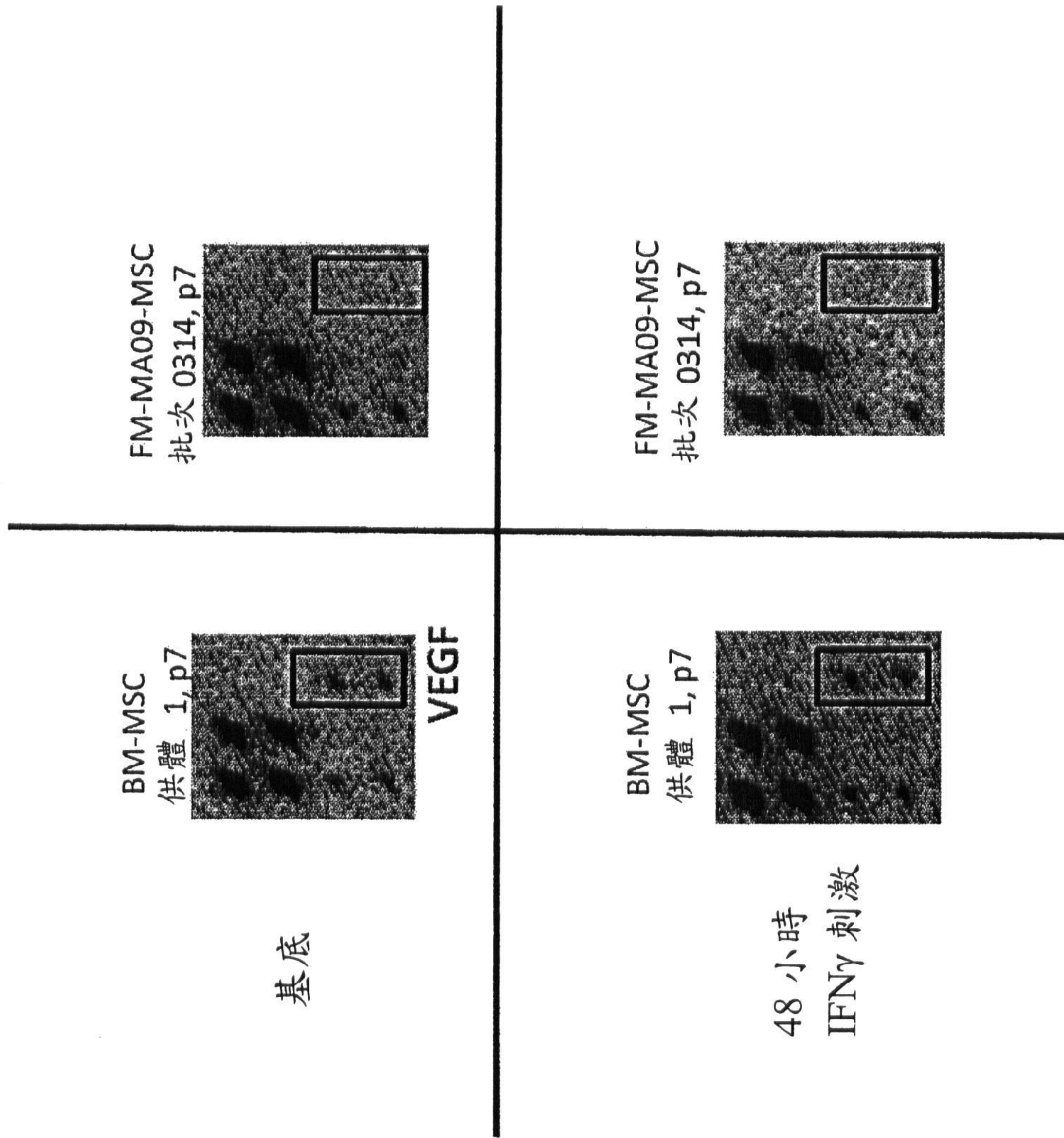


圖32