



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102387807 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 21

(21) 申请号 200980157394. 9

代理人 梁谋 林毅斌

(22) 申请日 2009. 12. 19

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 35/44 (2006. 01)

61/139425 2008. 12. 19 US

C12N 5/073 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/068881 2009. 12. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02010/071864 EN 2010. 06. 24

(83) 生物保藏信息

PTA-6068 2004. 06. 10

PTA-6067 2004. 06. 10

(71) 申请人 先进科技及再生医学有限责任公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·C·科尔特 A·J·基姆

C·K·沃德 A·戈谢夫斯卡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

权利要求书 2 页 说明书 57 页

序列表 4 页 附图 5 页

(54) 发明名称

肺部疾病和病症的治疗

(57) 摘要

本发明提供使用来源于脐带组织的细胞刺激和支持肺组织血管生成,提高肺组织的血流量,使由肺部疾病、病症和/或损伤损害的肺组织再生、修复和改善,并且保护患者的肺组织不受肺部疾病、病症和/或损伤引起的损害的组合物和方法。

1. 一种治疗肺部疾病、病症或损伤的患者的方法,所述方法包括将有效量的脐带组织衍生细胞给予患者以治疗肺部疾病、病症或损伤以及由此引起的损害,其中所述脐带组织衍生细胞来源于基本上无血的人脐带组织,其在培养时能够自我更新和扩增,并且具有分化成至少肺组织的细胞的潜力。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述肺部疾病、病症或损伤是或者其原因是阻塞性疾病或病症、限制性疾病或病症或者直接或间接损伤。

3. 一种治疗患有肺部疾病的患者的方法,所述方法包括将有效量的脐带组织衍生细胞给予患者以治疗肺部疾病,其中所述细胞来源于基本上无血的人脐带组织,并且在培养时能够自我更新和扩增。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述脐带组织衍生细胞不表达 hTERT 或端粒酶。

5. 权利要求 3 的方法,其中所述脐带组织衍生细胞呈 CD117 阴性。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞在体外被诱导分化成肺组织。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞与至少一种其它细胞类型一起给予。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述其它细胞类型是选自以下细胞的肺组织细胞:肺祖细胞、血管平滑肌细胞、血管平滑肌祖细胞、周细胞、血管内皮细胞、血管内皮祖细胞或其它多能或多潜能干细胞。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞与至少一种其它药物一起给予。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述药物是抗血栓生成药、抗炎药、免疫抑制剂、免疫调节剂、促血管生成药或抗凋亡药。

11. 权利要求 2 的方法,其中将所述细胞给予到肺部疾病、病症或损伤的部位。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述脐带组织衍生细胞通过注射、输注、植入患者的装置或通过植入含有所述细胞的基质或支架给予。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞对患者的肺组织发挥营养作用。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞对患者的血管平滑肌发挥营养作用。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述营养作用是血管平滑肌细胞增殖。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞对患者的血管内皮发挥营养作用。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述营养作用是血管内皮细胞增殖。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞诱导血管内皮细胞迁移到肺部疾病、病症或损伤的部位。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞诱导血管内皮祖细胞迁移到肺部疾病、病症或损伤的部位。

20. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞诱导血管平滑肌细胞迁移到肺部疾病、病症或损伤的部位。

21. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞诱导血管平滑肌祖细胞迁移到肺部疾病、病症或损伤的部位。

22. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞诱导周细胞迁移到肺部疾病、病症或损伤的部位。

23. 一种用于治疗肺部疾病、病症或损伤的患者的药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的载体和有效量的治疗肺部疾病、病症或损伤的脐带组织衍生细胞,其中所述

脐带组织衍生细胞来源于基本上无血的人脐带组织,其在培养时能够自我更新和扩增,并且具有分化成至少肺组织的细胞的潜力。

24. 一种用于治疗肺部疾病、病症或损伤的患者的药盒,所述药盒包括药学上可接受的载体、脐带组织衍生细胞群和使用药盒治疗患者的方法的说明书,其中所述脐带组织衍生细胞来源于基本上无血的人脐带组织,其在培养时能够自我更新和扩增,并且具有分化成至少肺组织细胞的潜力。

25. 一种用于治疗肺部疾病、病症或损伤的患者的药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的载体和由脐带组织衍生细胞制备的制剂,其中所述脐带组织衍生细胞来源于基本上无血的人脐带组织,其在培养时能够自我更新和扩增,并且具有分化成至少肺组织细胞的潜力。

26. 一种用于治疗肺部疾病、病症或损伤的患者的药盒,所述药盒包含权利要求 25 的药物组合物。

肺部疾病和病症的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 12 月 19 日申请的美国临时专利申请号 61/139,425 的权益, 所述申请的内容通过引用全部结合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及肺部病症、疾病和损伤的基于细胞的疗法或再生疗法的领域。

[0004] 发明背景

[0005] 本说明书中引用了多种出版物, 包括专利、已公布的申请和技术文章。这些引用出版物的每一种都通过引用其全部结合到本文中。

[0006] 肺病(包括慢性和急性肺病)依旧是全球发病和死亡的一个主要原因。慢性阻塞性肺病(COPD)是全球第四大死亡原因(Spurzem 和 Rennard, *Semin Respir Crit Care Med*, 2005 ;26 :142-153), 是由妨碍正常呼吸的结构性气道缩窄或粘液阻塞气道引起的。另外, 间质性肺病, 亦称肺纤维化, 被归类为包括多种慢性肺部病症在内的限制性疾病。慢性肺病的处理包括药物治疗、氧气疗法、手术和肺康复。

[0007] 虽然 90% 的 COPD 患者是吸烟者, 但只有 10% 的吸烟者患病, 这就表明遗传体质可能是重要的预后因素。(Siafakas and Tzortzaki, *Respir Med*, 2002 Aug. ;96(8) : 615-24)。吸烟者肺病的特征是慢性活动性炎症、气道粘液分泌过多和肺气肿(MacNee, *Proc Am Thorac Soc.*, 2005 ;2(4) :258-66 ;论述 290-1), 并且停止吸烟后只是部分可逆的。(Spurzem and Rennard, *Semin Respir Crit Care Med*, 2005 ;26 :142-153)。气道和肺实质炎症在慢性阻塞性肺病的发病机制中起着重要作用。已经证实香烟烟雾诱发肺炎, 即使停止暴露于香烟烟雾中, 最终也会导致 COPD。

[0008] 在慢性阻塞性肺病中, 肺气肿是决定发病率和死亡率的主要因素之一。该病的特征在于例如由于支持肺组织的结构(例如肺泡)遭破坏, 以及为肺泡提供营养的毛细血管遭破坏致使肺组织的弹性丧失。这种破坏可能是由炎症酶(例如弹性蛋白)引起的。肺气肿的定义是肺(包括呼吸性细支气管和肺泡)的外周空间扩大, 并伴随肺泡壁结构遭破坏。由于环境污染物、吸烟和其它暴露于有害物质增加的结果, 过去数十年中肺气肿患者的发病率已然升高。现目前的治疗标准表明, 只有肺移植可以为重度肺气肿提供医治。仍然需要治疗、修复和/或改善肺气肿(例如弹性蛋白酶诱发性肺气肿)患者肺损伤的适当而有益的方法。

[0009] 已对暴露于香烟烟雾的动物模型进行了研究, 以探查各种治疗性干预的病理学和功效。遗憾的是, 这些研究只取得了有限的成功。部分问题是通常采用的大鼠和小鼠品系在响应香烟烟雾时只显示轻度炎症和粘液分泌。(Guerassimov, A 等, *Am J Respir Crit Med*, 2004 Nov. 1 ;170(9) :974-80。电子刊物 2004 Jul. 28), 而且相应的损伤是快速可逆的。因此, 健康的实验室啮齿动物可能具有肺功能损伤后补偿和再生的奇特能力, 这可能成为其对发展中的 COPD 提供相对抵抗的基础。最新研究表明, 遗传倾向性自发性超敏(SH)大鼠具有 COPD 患者中也存在的表型(例如全身炎症、高凝性、氧化应激和免疫功能受抑制)。

(Yu, B 等, *Inhal Toxicol*, 2008 May ;20(7) :623-33)。因此, SH 大鼠模型可提供更为相关的实验性 COPD 模型。

[0010] 限制性肺病是发病和死亡的最常见原因之一, 并且具有三种主要病因, 即肺癌、肺炎和肺纤维化。特发性肺纤维化 (IPF) 是极有害的疾病, 其特征是进行性呼吸困难, 并且与高死亡率、进行性固定组织纤维化、结构扭曲和功能丧失有关。(Ortiz, LA 等, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2003 Jul. 8, 2003 ;100(14) :8407-11。电子刊物 2003 Jun. 18)。促纤维化细胞因子过量或抗纤维化细胞因子缺乏参与该病理过程。在美国, 估计特发性肺纤维化的发生率每 10 万人中从 3 例到 6 例不等。目前, 没有逆转或延迟疾病进程的有效疗法。大部分治疗, 例如皮质甾类、免疫抑制剂、免疫调节剂或抗纤维化药物, 目的是抑制炎症, 但是没有一种被证实可改变 IPF 疾病进程。因此, 存在对开发新的旨在减缓或停止纤维化、同时增强内源性肺修复和再生的疗法的重大需求。

[0011] 研究表明, 在博来霉素 (BLM) 损伤小鼠的受损肺部, 间充质干细胞 (MSC) 可分化成为肺泡上皮细胞, 而且 MSC 的移入可在受损肺组织中抑制炎症和胶原沉积。(Zhao, F 等, *Transplant Proceedings*, 2008 Jun. ;40(5) :1700-1705 ;Ortiz, LA 等, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2003 Jul. 8, 2003 ;100(14) :8407-11, 电子刊物 2003 Jun. 18 ;Rojas 等, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005 ;33 :145)。BLM 是具有抗肿瘤活性的细胞抑制抗生素, 并且是在动物模型中研究肺纤维化的公认化合物。BLM 诱发肺泡上皮细胞损伤和肺部炎症从而导致肺纤维化。

[0012] 急性肺损伤 (ALI) 和急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 也仍旧是重症特别护理情况下发病和死亡的重要原因。ALI 和 ARDS 是重大疾病, 其特征是在响应直接损伤 (例如溺水、肺炎、吸入毒气和肺挫伤) 或间接损伤 (例如重度脓毒症、输血、休克和胰腺炎) 时突发低氧血症伴发弥散性肺水肿。ALI 和 ARDS 目前通过机械通气和支撑性护理治疗。

[0013] 细胞疗法是转化医学 (translational medicine) 中最令人兴奋的领域之一, 并且正发展成为治疗众多临床病症的新的治疗平台。在过去 5 年内, 肺病细胞疗法领域持续快速发展。若干研究已证实采用细胞疗法治疗肺病的可行性。例如, 循环内皮祖细胞 (EPC) 可能有助于患病的肺血管系统的再生, 并且正在肺动脉高血压患者中进行研究。(Diller, G P 等, *Circulation*, 2008 Jun 10, 117(23) :3020-30, 电子刊物 2008 Jun 2)。另外, 最新出版物表明, 间充质干细胞 (MSC) 也抑制若干炎症性和免疫介导性肺病小鼠模型的肺损伤和炎症。(Weiss, D J 等, *Proc Am Thorac. Soc.*, 2008 Jul 15 ;5(5) :637-67)。尽管这些是有前景的发现, 但是几乎未关注对 ALI 细胞疗法的开发。

[0014] 目前, 令人感兴趣的是采用可以分裂和分化的干细胞或者其它来源的肌细胞 (包括平滑肌细胞和骨骼肌细胞) 以促进组织损伤 (例如因肺部疾病、病症或损伤所引起的肺损伤) 的修复或逆转。干细胞移植可用作重建靶组织的临床工具, 从而恢复生理和解剖结构功能性。干细胞技术的应用涉及面广, 包括组织工程学、基因疗法递送和细胞治疗药物, 即通过外源供应的产生或含有这些药物的活细胞或细胞组分将生物治疗药递送到目标位置。干细胞的鉴定刺激了旨在选择性产生用于再生医学的特异性细胞类型的研究。

[0015] 对于肺修复、再生、保护和改善, 以及对于在由肺部疾病、病症和 / 或损伤引起肺损伤之前、期间或之后改善血流量和氧气 /CO₂ 交换, 可靠的、充分表征的以及大量供应的具有分化成一系列肺组织 (包括血管结构) 的能力且基本上是均质的细胞群在各种诊断和治

疗应用中都会是有利的。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明的一个方面的特征在于治疗患有肺部疾病、病症和 / 或损伤的患者的方法。这类疾病、病症和 / 或损伤包括但不限于慢性阻塞性肺病 (COPD)、肺纤维化、急性肺损伤 (ALI)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 及其相关损害。

[0018] 本发明的一个方面的特征在于治疗患有肺部疾病、病症和 / 或损伤的患者的方法,所述方法包括以治疗肺部疾病、病症和 / 或损伤及其相关损害的有效量将脐带组织衍生细胞给予患者。

[0019] 在一个具体的实施方案中,肺部疾病、病症和 / 或损伤是阻塞性、限制性、和 / 或是由损伤 (例如与 ALI 和 / 或 ARDS 相关的损伤或导致 ALI 和 / 或 ARDS 的损伤) 引起的。在某些实施方案中,在给予前,体外诱导所述细胞分化成肺组织细胞,例如血管平滑肌细胞、周细胞或血管内皮谱系细胞。在其它实施方案中,对细胞进行遗传工程改造以产生促进肺部疾病、病症和 / 或损伤治疗的基因产物。

[0020] 在所述方法的一些实施方案中,细胞与至少一种其它的细胞类型一起给予,其它细胞类型可包括肺组织细胞,例如肺祖细胞、血管平滑肌细胞、血管平滑肌祖细胞、周细胞、血管内皮细胞、血管内皮祖细胞或其它多能或多潜能干细胞。可与脐带组织衍生细胞同时、之前或之后给予其它细胞类型。

[0021] 在其它实施方案中,所述细胞与至少一种其它药物一起给予,其它药物可以是例如抗血栓生成药、抗炎药、免疫抑制剂、免疫调节剂、促血管生成药或抗凋亡药。其它药物可与脐带组织衍生细胞同时、之前或之后给予。

[0022] 优选在肺部疾病、病症和 / 或损伤的部位或接近肺部疾病、病症和 / 或损伤的部位给予所述细胞,但是也可在所述部位的周边位置上给予细胞。可通过注射、输注、植入患者的装置或通过植入含有细胞的基质或支架给予所述细胞。所述细胞可在患者肺组织上发挥营养作用,例如扩增。所述细胞可诱导例如血管平滑肌细胞、血管内皮细胞、肺祖细胞、周细胞、血管平滑肌祖细胞或血管内皮祖细胞等肺组织细胞迁移到肺部疾病、病症和 / 或损伤的一个或多个部位。

[0023] 本发明的另一个方面的特征在于治疗患有肺部疾病、病症和 / 或损伤的患者的药物组合物和药盒,其包含药学上可接受的载体、稀释剂和 / 或缓冲剂以及脐带组织衍生细胞或由这类脐带组织衍生细胞制备的制剂。在一些优选的实施方案中,所述制剂包含 FGF 和 HGF。设计和 / 或配制药物组合物和药盒以实施如上所述的本发明的方法。

[0024] 按照本发明的另一个方面,可采用由脐带组织衍生细胞制备的制剂来实施上述方法,其中所述制剂包含脐带组织衍生细胞的细胞裂解物、脐带组织衍生细胞的胞外基质或脐带组织衍生细胞生长在其中的条件培养基。优选的是这类制剂包含 FGF 和 HGF。本发明的另一个方面包括用脐带组织衍生细胞的产物 (例如营养因子) 实施本发明。

[0025] 本发明的其它方面的特征是包括含脐带组织衍生细胞的细胞裂解物、胞外基质或条件培养基的制剂的药物组合物和药盒。所述组合物还可包含本领域已知的药学上可接受的载体、稀释剂和 / 或缓冲剂。本发明的其它方面的特征是用包含脐带组织衍生细胞的产物的药物组合物和药盒进行治疗。

[0026] 参照下面的发明详述和实施例可理解本发明的其它特征和优势。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1 图示 BALF 总蛋白浓度 :采用 Pierce BCA 蛋白质测定法测定总蛋白。每个数据点表示从一只动物获得的测量值。水平线表示所有测量值的平均值。进行了斯图登 t 检验分析。用下面的表格形式显示数据 (表 8)。

[0029] 图 2a 图示 肺匀浆物的细胞因子 / 趋化因子分析 :按照生产商的方案,使用小鼠 22- 多重微珠试剂盒 (22-multiplex bead kit) (Millipore),测定了肺匀浆物的 22 种不同的细胞因子 / 趋化因子的浓度,并用 BioRad Bioplex 机进行了分析。数据条形柱表示 6 个样品的平均值。用下面的表格形式显示数据 (图 3)。

[0030] 图 2b 图示 BALF 的细胞因子 / 趋化因子分析 :按照生产商的方案,使用小鼠 22- 多重微珠试剂盒 (Millipore),测定了 BALF 的 22 种不同的细胞因子 / 趋化因子的浓度,并用 BioRad Bioplex 机进行了分析。数据条形柱表示 6 个样品的平均值。数据见下面的表格形式 (图 4)。

[0031] 图 3 图示 肺匀浆物细胞因子 / 趋化因子分析 :按照生产商的方案,使用小鼠 22- 多重微珠试剂盒 (Millipore),测定了肺匀浆物的 22 种不同的细胞因子 / 趋化因子的浓度,并用 BioRad Bioplex 机进行了分析。

[0032] 图 4 图示 BALF 细胞因子 / 趋化因子分析 :按照生产商的方案,使用小鼠 22- 多重微珠试剂盒 (Millipore),测定了 BALF 的 22 种不同的细胞因子 / 趋化因子的浓度,并用 BioRad Bioplex 机进行了分析。

[0033] 发明详述

[0034] 在下面的说明性实施方案的详细说明中,参照了构成其组成部分的附图。这些实施方案的描述充分详细,使得本领域技术人员能够实施本发明,而且要理解的是,可以利用其它实施方案,并且可进行逻辑结构、机械、电学和化学改变而又不偏离本发明的精神或范围。为了避免本领域技术人员能够实施本文所述实施方案的不必要的细节,说明书可省略本领域技术人员已知的某些信息。因此,下面的发明详述不得理解为有限制意义。

[0035] 本说明书和权利要求书全文中使用了各种术语。这类术语以本领域术语的通用含义给出,除非另有说明。其它具体定义的术语可以与本文给出的定义一致的方式予以解释。

[0036] “肺组织”可包括但不限于所有的肺组织结构和相关组织,包括但不限于静脉、动脉、血管、毛细血管及其这类结构的组成部分或与这类结构相关的细胞类型;肺与胸膜组织;以及血管平滑肌、周细胞和血管内皮谱系和 / 或表型。

[0037] 本文使用的“呼吸系统或肺部疾病、病症和损伤”包括但不限于阻塞性肺病、限制性肺病、呼吸道感染 (上呼吸道与下呼吸道感染)、呼吸系统肿瘤、胸膜腔疾病和肺部血管疾病。由这些疾病、病症和 / 或损伤引起的肺组织损害可称为本发明范围内的肺损害。此外,本发明所包括的受损肺组织包括所有肺组织结构和相关组织,包括静脉、动脉、血管、毛细血管及其这类结构的组成部分或与这类结构相关的细胞类型。“阻塞性肺病”可包括 COPD、囊性纤维化、支气管扩张、细支气管炎、肺气肿和变应性支气管肺曲菌病。例如, COPD 由引发肺部异常炎症反应的有毒颗粒或气体 (最常见来自吸烟) 引起。较大气道中的炎症反应称为慢性支气管炎,人如果经常咳出痰,便可做出临床诊断。在肺泡中,炎症反应引起肺部组织破坏,一种称为肺气肿的过程。应当了解的是,这些组织涉及本发明时是与 COPD 相关的组织。COPD 的病因包括但不限于吸食烟草、职业性暴露于工作场所粉尘 (例如煤矿

开采、采金、棉纺织品工业和化学工业)、空气污染和遗传学病因。

[0038] 本文使用的“限制性肺病”亦称间质性肺病 (ILD)。这些疾病中的许多疾病是特发性的。实例包括:特发性肺纤维化、特发性间质性肺炎(若干类型)、结节病、嗜酸性细胞肺炎、淋巴管平滑肌瘤病、肺朗格汉斯细胞组织细胞增多病和肺泡蛋白沉积症。ILD 影响肺的间质组织:肺泡上皮、肺毛细血管内皮、基底膜、血管周和淋巴周组织。ILD 的大多数类型都涉及纤维化。

[0039] 呼吸系统肿瘤包括恶性肿瘤和良性肿瘤两者。恶性肿瘤包括例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌(腺癌、鳞状细胞癌和大细胞未分化癌)、淋巴瘤以及其它癌。良性肿瘤罕见,但可包括例如肺错构瘤和先天性畸形。

[0040] 本文使用的“急性肺损伤”(ALI) 是弥散性异质性肺损伤,其特征在于低氧血症、非心源性肺水肿、肺顺应性低下和广泛性毛细血管渗漏。ALI 是由局部或全身炎症的任何刺激物引起的。急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 比 ALI 更严重。本文使用的 ALI 和 ARDS 可表征为在响应直接损伤或间接损伤时突发的低氧血症和弥散性肺水肿。本文使用的“直接损伤”包括但不限于由溺水事故、肺炎、吸入毒气和肺挫伤造成的肺损伤。本文使用的“间接损伤”可源于例如重度脓毒症、输血、休克和胰腺炎。导致 ALI 和 ARDS 的这些损伤引起肺泡-毛细血管界面破坏、富含蛋白质的液体渗入间质组织和肺泡空间、细胞因子大量释放以及嗜中性粒细胞迁移。

[0041] 本发明的方法所包括的肺部疾病、病症和损伤是本领域已知的。每一种肺部疾病、病症和损伤的特征,包括相关并发症、病因和治疗,也都是本领域技术人员所掌握的。这包括本文未特别论述的肺部疾病、病症和损伤,因为它们与阻塞性和限制性肺部疾病、病症和损伤有关。

[0042] 用于本发明的细胞一般称为产后细胞或产后衍生细胞 (PPDC)。更准确地讲,所述细胞为“脐衍生细胞”或“脐带衍生细胞”(UDC) 或“脐带组织衍生细胞”(UTC)。另外,所述细胞可描述为干细胞或祖细胞,后一术语广义使用。术语“衍生(的)”用来表明是获自其生物来源并且体外生长或以别的方式操作的细胞(例如在生长培养基中培养以扩增细胞群和/或产生细胞系)。下面详细描述了脐干细胞的体外操作和本发明的脐衍生细胞的独特特征。

[0043] 干细胞是未分化的细胞,通过单细胞既自我更新又分化产生子代细胞的能力界定,包括自我更新祖细胞、非更新祖细胞和最终分化细胞。干细胞的特征还在于其从多胚层(内胚层、中胚层和外胚层)体外分化成多种细胞谱系的功能性细胞、以及在移植后产生多胚层的组织、并且在注射入胚胎中后基本上对大多数(如果不是全部的话)组织都产生影响的能力。

[0044] 根据干细胞的发育潜力将其分成:(1) 全能;(2) 多能;(3) 多潜能;(4) 寡能;和(5) 单能。全能细胞能够产生所有的胚胎细胞类型和胚胎外细胞类型。多潜能细胞能够产生所有的胚胎细胞类型。多能细胞包括能够产生一类细胞谱系的细胞,但全部都在特定组织、器官或生理系统内。例如,造血干细胞 (HSC) 可以产生包括 HSC(自我更新)、血细胞限制性寡能祖代及其正常血液组分的所有细胞类型和组分(例如血小板)的子代。寡能细胞可产生比多能干细胞更有限的一类细胞谱系。单能细胞能够产生单一细胞谱系(例如生精干细胞)。

[0045] 还可根据获得干细胞的来源来分类。成体干细胞一般是存在于包含多种分化细胞类型的组织中的多能未分化细胞。成体干细胞可以自我更新。在正常情况下,成体干细胞可分化成其来源组织和可能的其它组织类型的特化细胞类型。胚胎干细胞是来自胚泡期胚胎内细胞团的多潜能细胞。胎儿干细胞是来源于胎儿组织或膜的干细胞。产后干细胞是大体上来源于出生后可获得的胚外组织(即脐带)的多能或多潜能细胞。已经发现这些细胞具有多潜能干细胞特有的特征,包括快速增殖和分化成许多细胞谱系的潜力。产后干细胞可以是血液来源的(例如由脐带血得到的干细胞)或非血液来源的(例如由脐带和胎盘的非血液组织得到的干细胞)。

[0046] 使用不同术语描述培养中的细胞。“细胞培养物”一般是指取自活体并生长在控制条件下(“培养中”或“培养(的)”)的细胞。“原代细胞培养物”是在第一次继代培养之前直接取自生物体的细胞、组织或器官的培养物。当在促进细胞生长和/或分裂的条件下将细胞接种到生长培养基中时,培养中的细胞“扩增”,产生较大的细胞群。当培养中的细胞扩增时,细胞增殖的速率有时用细胞数目倍增所需要的时间来衡量。这被称为“倍增时间”。

[0047] 术语“细胞系”一般是指对原代细胞培养物进行一次或多次传代培养形成的细胞群。每轮的继代培养被称为一代。对细胞进行继代培养时,称为进行“传代”。特定的细胞群或细胞系,有时是指传代次数或用传代次数表征。例如,传代 10 次的培养的细胞群可称为 P10 培养物。原代培养物,即细胞从组织分离后的第一次培养物,称为 P0。在第一次继代培养后,细胞称为第二次培养物(P1 或传代 1)。在第二次继代培养后,细胞变为第三次培养物(P2 或传代 2)等等。本领域技术人员应了解的是,在传代期内,可能有多次群体倍增;因此培养物的群体倍增数大于传代数。在传代之间的一段时间内,细胞扩增(即群体倍增数)取决于许多因素,包括但不限于接种密度、基质、培养基、生长条件和传代之间的时间。

[0048] “分化”是非特化(“未定型(uncommitted)”)的或低特化的细胞获得特化细胞(例如神经细胞或肌细胞)的特征的过程。“分化(的)”细胞是在细胞谱系内位于更特化(“定型”)位置的细胞。当用于分化过程时,术语“定型(的)”是指细胞在分化途径中已进行到某一点上,在正常情况下,该点上的细胞将继续分化成特定的细胞类型或细胞类型的亚型,且在正常情况下,不会分化成不同的细胞类型或恢复到低分化的细胞类型。“去分化”是指细胞恢复到细胞谱系内低特化/定型的位置的过程。本文使用的细胞的“谱系”限定了细胞的遗传特征,即它来自哪种细胞,并可产生什么样的细胞。细胞的谱系将细胞置于发育和分化的遗传方案内。

[0049] 从广义上看,“祖细胞”是具有产生比自身更加分化的子代的能力并且仍保持补充祖代群的能力的细胞。根据此定义,干细胞本身也是祖细胞,因为它们是终末分化细胞的更前前体细胞。当提及本发明的细胞时,正如下面将更详细地描述一样,可以采用这种广义的祖细胞。以较窄的意义来看,祖细胞通常定义为在分化途径中是中间体的细胞,即它产生于干细胞并且在产生成熟细胞类型或细胞类型亚型时是中间体。这种祖细胞类型一般不能够自我更新。因此,如果本文提及这种类型的细胞,则是指“非更新祖细胞”或“中间体祖代或前体细胞”。

[0050] 就细胞或组织移植或者细胞替代疗法而言,本文使用了若干术语。术语“自体转移”、“自体移植”、“自体移植物”等是指其中细胞或移植供体同样是细胞或移植受体的治疗。术语“同种异体转移”、“同种异体移植”、“同种异体移植物”等是指其中细胞或移植供

体与受体是同一物种,但不是同一个体的治疗。其中供体细胞与受体是组织相容性匹配的细胞转移有时称为“同源转移”。术语“异种转移”、“异种移植”、“异种移植体”等是指其中细胞或移植供体与受体是不同物种的移植。

[0051] 可与术语“生物学上相容的载体”或“生物学上相容的培养基”互换使用的术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的培养基”一般是指不仅与治疗上给予的细胞和其它药物相容,而且适用于与人类和动物组织接触而无过度毒性、刺激性、变态反应或与合理利益/风险比相称的其它并发症的试剂、细胞、化合物、材料、组合物和/或剂型。正如本文将更详细描述的一样,适用于本发明的药学上可接受的载体包括液体、半固体(例如凝胶)和固体材料(例如细胞支架和基质、管、片层和本领域已知的和本文更详细描述的其它这类材料)。可以设计这些半固体和固体材料以在体内抵抗降解(生物不能降解的),或者可以将它们设计成在体内降解(生物可降解的、生物可蚀性的)。生物可降解材料还可以是生物再吸收的或生物可吸收的,即其可溶于并吸收进入体液中(一个实例为水溶性植入物),或者降解并通过转化成其它物质或分解后通过天然途径排除而最终从体内排除。一旦植入体内,便可根据所需要的释放率改变生物降解率。

[0052] “条件培养液”是其中特定细胞或细胞群经过培养然后弃去的培养基。将细胞在培养基中培养时可分泌细胞因子,细胞因子可为其它细胞提供营养支持。这类营养因子包括但不限于激素、细胞因子、胞外基质(ECM)、蛋白质、小泡、抗体和颗粒。含有细胞因子的培养基是条件培养液。

[0053] 一般而言,“营养因子”定义为促进细胞存活、生长、增殖和/或成熟,或者刺激提高细胞活性的物质。

[0054] 本文使用的术语“生长培养基”一般是指足以培养产后衍生细胞的培养基。具体地讲,培养本发明细胞的一种本发明优选的培养基包含 Dulbecco 改良必需培养基(DMEM)。特别优选的是 DMEM-低葡萄糖(DMEM-LG)(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)。DMEM-LG 优选补充了血清,最优选胎牛血清或人血清。通常加入 15% (v/v) 胎牛血清(例如特级胎牛血清, Hyclone, Logan Utah) 以及抗生素/抗真菌剂(优选 100 单位/毫升青霉素、100 毫克/毫升链霉素和 0.25 微克/毫升两性霉素 B;(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)) 及 0.001% (v/v) 2-巯基乙醇(Sigma, St. Louis Mo.)。在某些情况下,使用不同的生长培养基,或者提供不同的补充物,这些在正文中通常表示为生长培养基的补充物。在某些化学成分确定的培养基中,细胞可生长在根本不含血清的情况下。在这种情况下,细胞可能需要某些生长因子,可将生长因子加入培养基中以支持与维持细胞。在无血清培养基中要加入的用于生长的本发明的优选的因子包括 bFGF、EGF、IGF-I 和 PDGF 的一种或多种。在更优选的实施方案中,将 2、3 或全部 4 种因子都加入无血清或化学成分确定的培养基中。在其它实施方案中,将 LIF 加入无血清培养基以支持或促进细胞生长。

[0055] 本文使用的术语“标准生长条件”是指在包含 5% CO₂ 的标准大气下,保持相对湿度约 100%,于 37°C 培养细胞。虽然前述条件有益于培养,但是要理解的是,了解本领域培养细胞可用选项的技术人员能够改变这类条件。

[0056] 术语“有效量”是指有效产生特殊生物学效果的本文所述的化合物、材料或组合物的浓度或量。这类效果包括但不限于在患有本发明范围内的疾病、病症和损伤的肺损害的患者中,骨骼组织得到再生、修复或改善、改善血流量和/或刺激和/或支持血管生成。可

通过例如将本发明的细胞和 / 或组合物给予本文所述肺损害的患者以达到这类有效活性。至于体内给予患者 UTC, 有效量的范围可少至几百以下到多至几百万以上。在具体的实施方案中, 有效量可为约 10^3 – 约 10^{11} 个细胞, 更具体地讲为至少约 10^4 个细胞。应理解的是, 给予的细胞数将随待治疗的肺部疾病、病症或损伤的详情而变化, 包括但不限于待治疗的大小或总的体积 / 表面面积、待治疗区域给药位置的部位附近情况, 其中包括医学生物学者熟悉的因素。

[0057] 术语“治疗”是指在减轻或改善损伤、病理或病况中的任何成功事例或成功迹象, 包括任何客观或主观参数, 例如症状的减轻、缓解、减少; 或者使患者更耐受损伤、病理或病况; 减慢变性率或衰退率; 使变性的终点不那么虚弱; 改善患者身体或精神的舒适感; 或者延长存活时间。症状的治疗或改善可根据客观或主观参数, 包括身体检查或神经系统检查的结果。

[0058] 术语“有效期”、“有效时段”或“有效条件”一般是指要达到其预期结果的药剂或药物组合物所必需或优选的时段或其它可控条件 (例如体外方法的温度、湿度)。

[0059] 术语“个体”、“患者”或“受治疗者”在本文中互换使用, 是指用药物组合物或治疗组合物或按照本文所述方法治疗的动物, 优选哺乳动物, 更优选人。

[0060] 本文使用的术语“基质”一般是指与细胞一起给予患者的生物可降解的和 / 或生物再吸收的材料。基质可用作临时支架直到被新生长的细胞替代, 例如骨骼肌、周细胞、血管平滑肌或血管内皮组织。在一些实施方案中, 基质可供持续释放与细胞联用的营养因子或其它药物, 并且可为患者提供结构用于发育组织的生长。在其它实施方案中, 基质只为发育组织提供临时支架。基质可呈微粒形式 (直径大于 10 微米的大粒子或直径小于 10 微米的微粒子), 或者可呈结构上稳定的三维植入物的形式 (例如支架)。基质可以为浆状、水凝胶或三维结构, 例如立方体、圆柱体、管状、块段、薄膜、片层或合适的结构形式。

[0061] 本文使用的术语“支架”一般是指为细胞生长提供模板的三维多孔结构。支架由在体内随时间降解的生物可降解材料和 / 或生物再吸收材料构成。支架降解所花时间的长度可取决于材料的分子量。因此, 较高分子量的材料可产生较长时间内保持其结构完整性的聚合物支架; 而较低分子量则产生较慢的释放和较短的支架寿命。支架可通过本领域已知的任何方法制备。可用来形成支架的聚合物的实例包括天然聚合物和合成聚合物。

[0062] 本文使用的术语“分离细胞 / 分离物 / 分离 (isolate)”一般是指从其天然环境分离出来的细胞。该术语包括其天然环境中的宏观物理分离, 例如从供体动物中取出。在优选的实施方案中, 分离细胞不存在于组织中, 即将细胞与其正常接触的相邻细胞分离或脱离。优选细胞作为细胞悬液给予。本文使用的表述“细胞悬液”包括与培养基接触并通过例如将一块组织轻轻研磨而分离的细胞。

[0063] 在本文所描述的不同实施方案中, 本发明的特征在于利用来源于产后组织 (特别是脐组织) 的祖细胞和细胞群治疗肺部疾病、病症和 / 或损伤的方法和药物组合物。这些方法和药物组合物被设计来刺激和支持血管生成; 提高血流量; 使由于肺部疾病、病症和 / 或损伤引起的受损肺组织再生、修复和改善; 和 / 或保护肺组织免于这类疾病、病症和 / 或损伤。用于本发明的药物制剂和方法的细胞、细胞群和包含细胞裂解物、条件培养液等的制剂, 可参见美国专利申请号 2005/0032209、2005/0058631 和 2005/0054098 以及下文中的描述。

[0064] 按照本文所述方法,在足月妊娠或早产妊娠终止时或其后不久(例如在胎盘娩出后)回收哺乳动物脐带。可用烧瓶、烧杯、培养皿或袋等无菌容器将产后组织从分娩地点转移到实验室。容器可装有溶液或培养基,包括但不限于盐溶液,例如 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)(亦称 Dulbecco 极限必需培养基)或磷酸缓冲盐溶液(PBS),或用于转移用于移植器官的任何溶液,例如威斯康星州大学溶液(University of Wisconsin solution)或全氟化合物溶液。可将一种或多种抗生素和/或抗真菌剂(例如但不限于青霉素、链霉素、两性霉素 B、庆大霉素和制霉菌素)加入培养基或缓冲剂中。产后组织可用抗凝血溶液(例如含肝素溶液)漂洗。优选在提取 UTC 前将组织保存于约 4℃-约 10℃。甚至更优选在提取 UTC 前组织不被冷冻。

[0065] UTC 的分离优选发生在无菌环境中。可通过本领域已知方法从胎盘分离出脐带。优选在分离 UTC 前从产后组织除去血液和碎片。例如,产后组织可用缓冲溶液洗涤,缓冲溶液包括但不限于磷酸缓冲盐溶液。洗涤缓冲液还可包含一种或多种抗真菌剂和/或抗生素,包括但不限于青霉素、链霉素、两性霉素 B、庆大霉素和制霉菌素。

[0066] 包含脐带或其片段或部分的产后组织优选通过机械力(切碎或剪切力)分解。在本发明的优选实施方案中,分离步骤还利用酶消化过程。本领域已知从复杂的组织基质中分离单个细胞以利于培养生长的许多有益的酶。消化酶从弱消化(例如脱氧核糖核酸酶和中性蛋白酶、分散酶)到强消化(例如木瓜蛋白酶和胰蛋白酶),并且是市售可获得的。这类酶的非穷尽性例子包括黏液溶解酶活性、金属蛋白酶、中性蛋白酶、丝氨酸蛋白酶(例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶或弹性蛋白酶)和脱氧核糖核酸酶。本发明优选的酶活性选自金属蛋白酶、中性蛋白酶和黏液溶解活性。例如,已知胶原酶可用于从组织中分离出各种细胞。脱氧核糖核酸酶可以消化单链 DNA,并可使分离期间的细胞凝集降到最低。优选的方法包括用胶原酶和分散酶或胶原酶、分散酶和透明质酸酶进行酶处理。本领域技术人员应理解的是,本领域已知许多用于从各种组织来源分离细胞的这类酶处理法,并且装备良好,用以评价新的或其它的酶或酶组合在分离本发明细胞中的用途。优选的酶处理可长达约 0.5-2 小时或更长。在其它优选的实施方案中,在分离步骤的酶处理期间将组织于约 37℃ 温育。

[0067] 可以使用分离细胞开始或接种细胞培养物。将分离细胞转移到未用或用胞外基质或配体(例如层粘连蛋白、胶原(天然、变性或交联胶原)、明胶、纤连蛋白和其它胞外基质蛋白)包被的无菌组织培养瓶中。将细胞在能够维持细胞生长的任何培养基中培养,培养基例如但不限于 DMEM(高或低葡萄糖)、高级 DMEM、DMEM/MCDB 201、Eagle 基础培养基、Ham F10 培养基(F10)、Ham F-12 培养基(F12)、Iscoven 改良 Dulbecco 培养基、间充质干细胞生长培养基(MSCGM)、DMEM/F12、RPMI 1640 以及以商品名 CELL-GRO-FREE(Mediatech, Inc., Herndon, Va.) 销售的血清/无血清培养基。培养基可补充一种或多种成分,包括例如胎牛血清(FBS),优选约 2-15% (v/v);马血清(ES);人血清(HS); β -巯基乙醇(BME 或 2-ME),优选约 0.001% (v/v);一种或多种生长因子,例如血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、白细胞抑制因子(LIF)和红细胞生成素(EPO);氨基酸,包括 L-缬氨酸;以及一种或多种抗生素和/或抗真菌剂以控制微生物污染,例如单独或组合的青霉素 G、硫酸链霉素、两性霉素 B、庆大霉素和制霉菌素。培养基优选包含生长培养基(例如 DMF-M-低葡萄糖、血清、BME 和抗生素)。

[0068] 将细胞以允许细胞生长的密度接种到培养瓶中。在一个优选的实施方案中,将细胞培养在约 0% - 约 5% 体积 CO₂ 气氛中。在一些优选的实施方案中,将细胞培养在约 2% - 约 25% O₂ 气氛下,优选约 5% - 约 20% O₂ 气氛下。细胞优选培养在约 25°C - 约 40°C 的温度下,更优选培养在 37°C 下。优选将细胞在培养箱中培养。培养瓶中的培养基可以是静止的或是搅拌的,例如采用生物反应器。UTC 优选生长在低氧化应激(例如添加谷胱甘肽、维生素 C、过氧化氢酶、维生素 E、N-乙酰半胱氨酸)下。本文使用的“低氧化应激”是指无损害培养细胞的自由基或损害培养细胞的自由基最低的条件。

[0069] 最适培养基的选择、培养基制备和细胞培养技术的方法是本领域众所周知的,并可参见各种来源的参考文献,包括 Doyle 等(主编),1995, *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley & Sons, Chichester; 以及 Ho and Wang(主编),1991, *Animal Cell Bioreactors*, Butterworth-Heinemann, Boston, 它们均通过引用结合到本文中。

[0070] 在本发明的一些实施方案中,使 UTC 传代,或移到单独的培养瓶中,培养瓶中装有与最初使用的相同或不同类型的新鲜培养基,细胞群在其中可进行有丝分裂性扩增。可以使用在传代 0 和衰老之间任一点上的本发明的细胞。细胞优选传代约 3 次 - 约 25 次,更优选传代约 4 次 - 约 12 次,优选传代 10 次或 11 次。可以进行克隆和 / 或亚克隆以证实已分离出克隆细胞群。

[0071] 在本发明的一些方面,将产后组织中存在的不同细胞类型分级分离成亚群,从中可分离出 UTC。分级分离或选择可采用细胞分离的标准技术实现,包括但不限于酶处理以将产后组织分解成其组分细胞,接着克隆,并选择特异性细胞类型,包括但不限于:根据形态学和 / 或生物化学标记进行选择;所需细胞的选择性生长(阳性选择);不需要细胞的选择性破坏(阴性选择);例如用大豆凝集素基于混合细胞群的差异性细胞凝集性进行分离;冻融方法;混合群中细胞的差异性粘着性质;过滤;常规离心和区带离心;离心淘析法(逆流离心);单位重力分离;逆流分布法;电泳和荧光激活细胞分选法(FACS)。

[0072] 根据需要更换培养基。例如,用移液管小心地从培养皿中吸出培养基,并用新鲜培养基补充。继续温育直到培养皿中蓄积足够数目或密度的细胞。此后,可取出存在的任何原始移植组织部分,并采用标准技术进行胰蛋白酶消化或使用细胞刮板从培养皿中分离出其余的细胞。在胰蛋白酶消化后,收集细胞,移入新鲜培养基中,并如上温育。在一些实施方案中,在胰蛋白酶消化后约 24 小时,更换培养基至少一次以除去任何浮动细胞。培养物中剩下的细胞为 UTC。

[0073] 可将 UTC 低温保存。因此,在下文更详尽描述的一个优选实施方案中,可在小孩出生后从合适的产后组织得到用于自体转移的 UTC(用于母亲或小孩),然后低温保存,以备随后需要进行移植时使用。

[0074] 可通过下列方法表征 UTC:例如生长特性(例如群体倍增能力、倍增时间、传代至衰老)、核型分析(例如正常核型;母体谱系或新生儿谱系)、流式细胞术(例如 FACS 分析)、免疫组织化学和 / 或免疫细胞化学(例如用于检测表位)、基因表达谱分析(例如基因芯片阵列;聚合酶链式反应(例如反转录酶 PCR、实时 PCR 和常规 PCR))、蛋白质阵列、蛋白质分泌(例如通过血浆凝固分析法或 PDC- 条件培养液分析,例如通过酶联免疫吸附测定法(ELISA))、混合淋巴细胞反应(例如衡量 PBMC 的刺激)和 / 或本领域已知的其它方法。

[0075] 来源于脐组织的 UTC 的实例于 2004 年 6 月 10 日存入美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), 指定的 ATCC 保藏号如下: (1) 品系名 UMB 022803(P7) 指定为保藏号 PTA-6067; 和 (2) 品系名 UMB 022803(P17) 指定为保藏号 PTA-6068。

[0076] 在不同的实施方案中, UTC 具有一种或多种下列生长特征: (1) 培养生长需要 L-缬氨酸; (2) 能够在含有约 5% - 约 20% 氧气的气氛下生长; (3) 在培养达到衰老前具有至少约 40 个倍增的潜力; 和 (4) 在未包被的组织培养瓶中贴壁和扩增或者在用明胶、层粘连蛋白、胶原、聚鸟氨酸、玻连蛋白或纤连蛋白包被的组织培养瓶中贴壁和扩增。

[0077] 在某些实施方案中, UTC 具有正常核型, 这在细胞传代时得以保持。核型分析的方法是可获得的, 并为本领域技术人员所知。

[0078] 在其它实施方案中, UTC 可通过某些蛋白质的产生来表征, 包括: (1) 组织因子、波形蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白的至少一种的产生; 和 (2) 通过流式细胞术检测的 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、PD-L2 和 HLA-A、B、C 细胞表面标记的至少一种的产生。在其它实施方案中, UTC 可通过流式细胞术检测 CD31、CD34、CD45、CD80、CD86、CD117、CD141、CD178、B7-H2、HLA-G 和 HLA-DR、DP、DQ 细胞表面标记的至少一种不产生来表征。特别优选的是产生以下至少两种的细胞: 组织因子、波形蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白。更优选的是产生以下所有三种蛋白质的细胞: 组织因子、波形蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白。

[0079] 在其它实施方案中, UTC 可通过基因表达表征, 与是成纤维细胞、间充质干细胞或髂嵴骨髓细胞的人细胞相比, 编码至少一种以下的蛋白质的基因增加: 白介素 8; reticulon 1; 趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 1 (黑素瘤生长刺激活性, α); 趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 6 (粒细胞趋化蛋白 2); 趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 3; 肿瘤坏死因子, α 诱导蛋白 3; C 型凝集素超家族成员 2; 维尔姆斯瘤 1 (Wilms tumor 1); 醛脱氢酶 1 家族成员 A2; 肾素; 氧化型低密度脂蛋白受体 1; 人克隆 IMAGE:4179671; 蛋白激酶 C ζ ; 假设蛋白 DKFZp564F013; 在卵巢癌 1 中下调; 以及得自克隆 DKFZp547k1113 的人基因。

[0080] 在另外其它的实施方案中, UTC 可通过基因表达表征, 与是成纤维细胞、间充质干细胞或髂嵴骨髓细胞的人细胞相比, 编码以下至少一种产物的基因表达降低: 矮小同源框 2 (short stature homeobox 2); 热激 27kDa 蛋白 2; 趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 12 (基质细胞衍生因子 1); 弹性蛋白 (主动脉瓣上狭窄、Williams-Beuren 综合征); 人 mRNA; cDNA DKFZp586M2022 (得自克隆 DKFZp586M2022); 间充质同源框 2 (生长终止特异性同源框); sine oculis 同源框同源物 1 (果蝇 (*Drosophila*)); 晶体蛋白, α B; 形态发生紊乱关联激活因子 2; DKFZP586B2420 蛋白; 类似于 neuralin 1; 四连蛋白 (纤溶酶原结合蛋白); src 同源物 3 (SH3) 和富含半胱氨酸的结构域; 胆固醇 25 羟化酶; runt 相关转录因子 3; 白介素 11 受体, α ; 原胶原 C-内肽酶增强子; 卷曲同源物 7 (果蝇); 假设基因 BC008967; 胶原, VIII 型, α 1; 生腱蛋白 C (六臂蛋白 (hexabrachion)); iroquois 同源框蛋白 5; 膜铁转运辅助蛋白; 整联蛋白, β 8; 突触小泡糖蛋白 2; 成神经细胞瘤, 致肿瘤性抑制 1; 胰岛素样生长因子结合蛋白 2, 36kDa; 人 cDNA FLJ12280 fis, 克隆 MAMMA1001744; 细胞因子受体样因子 1; 钾中 / 小电导钙激活通道, 超家族 N, 成员 4; 整联蛋白, β 7; 具有 PDZ 结合基序的转录辅激活物 (TAZ); sine oculis 同源框同源物 2 (果蝇); KIAA1034 蛋白; 突触小泡相关膜蛋白 5 (肌短蛋白 (myobrevin)); 含 EGF 的纤连蛋白样胞外基质蛋白 1; 早期生长应答蛋白

3;末梢更少同源框5(distal-less homeo box 5);假设蛋白FLJ20373;醛酮还原酶家族1,成员C3(3- α 羟类固醇脱氢酶,II型);双糖链蛋白聚酶(biglycan);具有PDZ结合基序的转录辅激活物(TAZ);纤连蛋白1;脑啡肽原;整联蛋白, β 样1(具有EGF样重复结构域);人mRNA全长插入cDNA克隆EUROIMAGE 1968422;EphA3;KIAA0367蛋白;利尿钠肽受体C/鸟苷酸环化酶C(心钠肽受体C(atrionatriuretic peptide receptor C));假设蛋白FLJ14054;人mRNA;cDNA DKFZp564B222(得自克隆DKFZp564B222);BCL2/腺病毒E1B 19kDa相互作用蛋白3样;AE结合蛋白1以及细胞色素c氧化酶亚基VIIa多肽1(肌肉)。

[0081] 在其它实施方案中,UTC可以通过至少一种以下物质的分泌进行表征:MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1a、RANTES和TIMP1。在一些实施方案中,UTC的特征可以是不分泌以下物质的至少一种:TGF- β 2、ANG2、PDGFbb、MIP1b、I309、MDC和VEGF,根据ELISA测定。

[0082] 在一些优选的实施方案中,UTC来源于基本上无血的脐带组织,能够自我更新并在培养时扩增,生长需要L-缬氨酸,可生长在至少约5%的氧气下,并且包括至少一个以下特征:(1)至少约40个培养倍增的潜力;(2)在未包被组织培养瓶或用明胶、层粘连蛋白、胶原、聚鸟氨酸、玻连蛋白或纤连蛋白包被的组织培养瓶中贴壁和扩增的能力;(3)产生波形蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白;(4)产生CD10、CD13、CD44、CD73和CD90;和(5)基因表达,与是成纤维细胞、间充质干细胞或髂嵴骨髓细胞的人细胞相比,编码白介素8和reticulon 1的基因增加。在一些实施方案中,这类UTC不产生CD45和CD117。

[0083] 上述UTC可用于治疗患有外周血管疾病的患者的方法中,可用于治疗外周血管疾病的药物组合物中,例如,其中这类组合物包含具有这些特征的细胞和药学上可接受的载体,并且可用于制备、使用和实施本文描述和列举的这类方法和药物组合物的药盒。另外,上述UTC可用于产生细胞条件培养液或配成制品,例如细胞提取物和亚细胞部分,它们可用于制备、使用和实施本文描述和列举的这类方法和药物组合物。

[0084] 在优选的实施方案中,细胞包括两种或更多种以上所列的生长、蛋白质/表面标记产生、基因表达或物质分泌特征。更优选为包括3、4、5或更多种特征的细胞。还更优选为包括6、7、8或更多种特征的UTC。本发明还更优选为包括上述全部特征的细胞。

[0085] 在本发明优选的用于本发明的细胞中,其若干方面为具有上述特征的UTC,更具体地讲,为其中细胞具有可传代的正常核型和保持正常核型的UTC,甚至其中细胞表达标记CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 和HLA-A、B、C的任一种,以及其中细胞产生免疫学上可检测的与所列标记相应的蛋白质的UTC。还更优选为除上述特征外,不产生与标记CD31、CD34、CD45、CD117、CD141或HLA-DR、DP、DQ的任一种相应的蛋白质的细胞,根据流式细胞术检测。

[0086] 具有沿导致各种表型的谱系分化的潜力的某些细胞是不稳定的,因此可自发分化。本发明优选的用于本发明的是不沿下列细胞谱系自发进行分化的细胞:例如成肌细胞、骨骼肌细胞、血管平滑肌细胞、周细胞、hemangiogenic、血管生成细胞、血管形成细胞或血管内皮细胞谱系。就细胞表面产生的细胞标记而言,以及就各种基因的表达方式而言,优选的细胞在生长培养基中生长时是基本稳定的,例如应用以商品名GENECHIP(Affymetrix, Inc., Santa Clara, Calif.)销售的医学诊断测定法测定。在传代期间和通过多次群体倍增时,细胞在例如其表面标记特征方面基本保持不变。

[0087] 本发明的另一个方面的特征在于上述 UTC 群的用途。在一些实施方案中,细胞群可以为异质的。本发明的异质细胞群可包含至少约 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的本发明的 UTC。本发明的异质细胞群还可包含干细胞或其它祖细胞,例如成肌细胞或其它肌祖细胞、成血管细胞或血管前体细胞;或者其还可包含完全分化的骨骼肌细胞、平滑肌细胞、周细胞或血管内皮细胞。在一些实施方案中,细胞群基本上是均质的,即基本上只包含 UTC(优选至少约 96%、97%、98%、99% 以上的 UTC)。本发明的均质细胞群可包含脐衍生细胞。均质的脐衍生细胞群优选不含母体谱系的细胞。细胞群的均质性可通过本领域已知的任何方法实现,例如按照已知方法通过细胞分选(例如流式细胞术)或通过克隆扩增。因此,优选的均质 UTC 群可包含产后衍生细胞的克隆细胞系。当分离出具有非常需要的功能性的细胞克隆时,这类 UTC 群是特别有益的。

[0088] 本文还提供的是利用在一种或多种因子存在下,或在沿血管平滑肌、血管内皮或周细胞途径刺激干细胞分化的条件下温育的细胞群。这类因子是本领域已知的,而且本领域技术人员应了解的是,可用例行实验实现合适的分化条件的确定。这类条件的最优化可通过统计学实验设计和分析来实现,例如响应曲面法(response surface methodology)允许生物培养中的多个变量同时最优化。本发明优选的因子包括但不限于生长或营养因子、趋化因子、细胞因子、细胞产物、脱甲基试剂和目前已知的或稍后确定的刺激干细胞沿例如血管生成、hemangiogenic、形成血管、骨骼肌、血管平滑肌、周细胞或血管内皮途径或谱系进行分化的其它刺激物。

[0089] 还可对 UTC 进行遗传修饰以产生治疗上有益的基因产物、产生有利于或支持其它血管形成或生长的血管生成剂、或者产生将内皮祖细胞募集到肺损害部位的因子。内皮祖细胞有利于血管生成和血流量,特别是在缺血事件后。(Urbich C and Dimmeler S, Circ. Res., 2004 ;95 :343-53)。在内皮细胞募集中起作用的因子包括但不限于 VEGF、基质衍生因子-1(SDF-1)、红细胞生成素(EPO)、G-CSF、他汀类、雌激素(strogen)、PPAR- γ 、CXCR4、FGF 和 HGF。遗传修饰可以采用不同载体的任一种完成,包括但不限于整合型病毒载体,例如反转录病毒载体或腺伴随病毒载体;非整合型复制载体,例如乳头状瘤病毒载体、SV40 载体、腺病毒载体;或复制缺陷型病毒载体。将 DNA 导入细胞的其它方法包括使用脂质体、电穿孔、基因枪或者通过直接 DNA 注射。

[0090] 优选被一个或多个合适的表达调控元件调控的 DNA 或与一个或多个合适的表达调控元件有效连接的 DNA 转化或转染宿主细胞,表达调控元件例如启动子或增强子序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点和选择标记。任何启动子都可用来驱动插入基因的表达。例如,病毒启动子包括但不限于 CMV 启动子/增强子、SV 40、乳头状瘤病毒、埃巴(Epstein-Barr)病毒或弹性蛋白基因启动子。在一些实施方案中,用于调控目标基因表达的调控元件可供调节表达基因,使得只有在体内需要时才合成产物。如果需要瞬时表达,在非整合型和/或复制缺陷型载体中优选采用组成型启动子。或者,需要时,可使用诱导型启动子驱动插入基因的表达。诱导型启动子包括但不限于与金属硫蛋白和热激蛋白质相关的启动子。

[0091] 在引入外源 DNA 后,可使工程细胞在滋养培养基中生长,然后转换到选择性培养基中。外源 DNA 的选择性标记赋以对这种选择的抗性,并使细胞将例如质粒上的外源 DNA 稳定整合至其染色体上,并生长形成转化灶(foci),进而可将基因座克隆并扩增到细胞系中。

这种方法可有利地用于对表达基因产物的细胞系进行改造。

[0092] 可对本发明的细胞进行遗传改造以“敲除”或“敲减”促进植入部位炎症或排斥的因子的表达。下面论述了用于降低靶基因表达水平或靶基因产物活性水平的负调节技术。本文使用的“负调节”是指与缺乏调节处理时的靶基因产物水平和 / 或活性相比,靶基因产物水平和 / 或活性降低。可采用多种技术降低或敲除骨骼肌细胞、血管平滑肌细胞、周细胞、血管内皮细胞或其祖细胞的天然基因的表达,包括例如采用同源重组技术钝化基因而抑制表达。通常,编码蛋白质重要区域(或该区域的外显子 5')的外显子被阳性选择标记(例如 neo)中断,防止由靶基因产生正常的 mRNA,并引起该基因钝化。还可以通过使部分基因缺失,或者通过缺失整个基因,使基因钝化。可以使用具有在基因组中相离很远的与靶基因同源的两个区域的构建体,使间插在两个区域的序列缺失。(Mombaerts 等,Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1991 ;88 :3084-87)。反义序列、DNA 酶、核酶、小干扰 RNA(siRNA) 和抑制靶基因表达的这类其它分子也可用来降低靶基因活性的水平。例如,已经证实,抑制主要组织相容性基因复合体(HLA)的表达的反义 RNA 分子对于免疫应答是最多功能的。三股螺旋分子可更进一步地用于降低靶基因活性的水平。

[0093] 在其它方面,本发明利用由 UTC 制备的细胞裂解物和细胞可溶性部分,或者包含 UTC 的异质或均质细胞群,以及已经遗传改造的或已被刺激沿骨骼肌、血管平滑肌、周细胞或血管内皮途径分化的 UTC 或 UTC 群体。这类裂解物及其部分具有许多用途。例如,体内使用 UTC 裂解物可溶性部分(即基本上不含膜)可提供有益的胞内环境,以同种异体方式用于患者而不引入很可能引发排斥或其它不良免疫应答的大量的细胞表面蛋白。裂解细胞的方法是本领域众所周知的,包括机械破坏、酶破坏或化学破坏或其组合的各种方式。可直接在细胞的生长培养基中由细胞制备这类细胞裂解物,因此含有分泌的生长因子等,或者可由用例如 PBS 或其它溶液洗涤的不含培养基的细胞制备。如是优选的话,可以大于起始细胞群密度的浓度,将洗涤细胞重新悬浮。

[0094] 在一个实施方案中,例如通过破坏细胞而随后又不分离细胞部分来制备完整的细胞裂解物。在另一个实施方案中,通过本领域已知的常规方法,例如离心、过滤或类似方法,从细胞可溶性部分分离出细胞膜部分。

[0095] 由产后衍生细胞群制备的细胞裂解物或细胞可溶性部分可照原样使用、通过例如超滤或冻干甚至干燥进一步浓缩、部分纯化、与本领域已知的药学上可接受的载体或稀释剂混合或者与生物制品(例如药学上有用的蛋白质组合物)等其它化合物混合使用。细胞裂解物或其部分可以体外或体内使用,可以单独或与例如自体活细胞或同源活细胞一起使用。如果引入体内的话,则裂解物可局部引入治疗部位,或者远离治疗部位引入,以向患者提供例如所需要的细胞生长因子。

[0096] 在一个进一步的实施方案中,可以体外培养 UTC 以产生高产量的生物产物。可以采用本文所述的培养技术,对天然产生的特定目标生物产物(例如营养因子)或者经遗传改造产生的生物产物的 UTC 进行克隆扩增。或者,可以在诱导分化成骨骼肌、血管平滑肌、周细胞或血管内皮谱系的培养基中扩增细胞。在每种情况下,采用标准分离技术,例如差异蛋白质沉淀、离子交换层析法、凝胶过滤层析法、电泳和 HPLC 等几种方法,可容易地从条件培养液中分离出由细胞产生并分泌到培养基中的生物产物。可采用“生物反应器”以利用进料流动法,例如体外三维培养。基本上,新鲜培养基通过三维培养物时,生物产物从培养

物中洗出,然后如上所述从流出物中分离出。

[0097] 或者,目标生物产物可保持在细胞内,因此,其收集可能需要如上所述使细胞裂解。然后可采用任一种或多种以上所列技术纯化生物产物。

[0098] 在其它实施方案中,本发明使用来自培养 UTC 的条件培养液如下所述进行体外和体内应用。UTC 条件培养液的使用允许将由 UTC 分泌的有益营养因子同种异体地用于患者而无需引入可能引发排斥或其它不良免疫应答的完整细胞。通过将细胞在培养基中培养,然后从培养基中除去细胞,来制备条件培养液。

[0099] 由脐带衍生细胞群制备的条件培养液可照原样使用、通过例如超滤或冻干甚至干燥进一步浓缩、部分纯化、与本领域已知的药学上可接受的载体或稀释剂混合或者与生物制品(例如药学上有益的蛋白质组合物)等其它化合物混合使用。条件培养液可以体外或体内使用,可单独或与例如自体或同源活细胞组合使用。如果体内引入的话,则条件培养液可在治疗部位局部引入,或远离治疗部位引入,以向患者提供所需要的细胞生长因子或营养因子。

[0100] 在另一个实施方案中,制备、收集和使用由在液体、固体或半固体基质上培养 UTC 产生的胞外基质(ECM)作为将活细胞植入需要组织修复或置换的受治疗者体内的替代方法。在所需量的 ECM 分泌到支架的条件下,将 UTC 在本文其它部分描述的三维支架上进行体外培养。除去包含新组织的细胞,并对 ECM 进行加工备用,例如用作注射用制剂。为了实现这一点,杀死支架上的细胞,从支架除去任何细胞碎片。该步骤可以多种不同的方式进行。例如,可将活组织在液氮中速冻而无需冷冻保存剂,或者可将组织浸入无菌蒸馏水中,使得细胞在响应渗透压时破裂。

[0101] 一旦杀死细胞,则可以破坏细胞膜,通过温和洗涤用品(例如 EDTA、CHAPS 或两性离子洗涤剂)处理除去细胞碎片。或者,可对组织进行酶消化和/或用分解细胞膜并可除去细胞内含物的试剂提取。这类酶的实例包括但不限于透明质酸酶、分散酶、蛋白酶和核酸酶。洗涤剂的实例包括非离子洗涤剂,例如烷基芳基聚醚醇(TRITON X-100)、辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Rohm and Haas, Philadelphia, Pa.)、BRIJ-35、聚乙氧基乙醇月桂基醚(Atlas Chemical Co., San Diego, Calif.)、聚山梨醇酯 20(TWEEN 20)、聚乙氧基乙醇山梨醇酐单月桂酸酯(Rohm and Haas, Philadelphia, Pa.)、聚乙烯月桂基醚(Rohm and Haas, Philadelphia, Pa.);以及离子洗涤剂(例如十二烷基硫酸钠)、在支链或非支链上含有 7-22 个碳原子的硫酸化高级脂族醇、磺化烷烃和磺化烷基芳烃。

[0102] ECM 的收集可按不同方式实现,至少部分取决于是否在生物可降解的或非生物可降解的三维支架(如在金属情况下)上形成的新组织。例如,如果支架是非生物可降解的,则可对支架进行超声处理、高压喷水、机械刮擦或用洗涤剂或酶温和处理或上述的任何组合,从而取出 ECM。

[0103] 如果支架是生物可降解的,则可通过例如使支架降解或溶于溶液中来收集 ECM。或者,如果生物可降解的支架由本身可注射的材料以及 ECM 构成,则可对支架和 ECM 进行全面处理用于随后的注射。或者,可通过上述用于从非生物可降解的支架中收集 ECM 的任何方法,从生物可降解的支架中取出 ECM。优选设计整体收集方法,使得 ECM 不会变性。

[0104] 在收集 ECM 后,可对 ECM 进行进一步加工。例如,可采用本领域众所周知的技术(例如超声处理)使 ECM 匀浆成细粒,使得它能够通过外科用针。需要时,还可通过 γ 辐

照,使 ECM 的组分交联。优选对 ECM 辐照 0.25-2 兆拉德以使 ECM 灭菌并交联。化学交联使用的试剂(例如戊二醛)可能是有毒的,但一般不是优选的。

[0105] 可通过用本发明的细胞产生的 ECM 与一种或多种其它细胞类型的 ECM 混合来调节蛋白质(例如 ECM 中存在的各种类型的胶原)的量和/或比率。另外,可将蛋白质、生长因子和/或药物等生物活性物质掺入 ECM 中。示例性的生物活性物质包括在注射部位促进愈合和组织修复的组织生长因子,例如 TGF- β 等。这类其它的成分可与例如完整细胞裂解物、可溶性细胞部分或进一步纯化的组分和由 UTC 产生的产物一起用于上文描述的任何实施方案中。

[0106] 另一方面,本发明提供以各种方法利用 UTC、UTC 群、UTC 的组分和产物的药物组合物以治疗由外周缺血事件引起的损伤或损害。某些实施方案包括包含活细胞(仅 UTC 或其它细胞类型混合)的药物组合物。其它实施方案包括包含 UTC 细胞组分(例如细胞裂解物、可溶性细胞部分、条件培养液、ECM 或任何上述组分)或产物(例如由 UTC 天然产生的或通过遗传修饰产生的营养因子和其它生物因子、得自 UTC 培养物的条件培养液)的药物组合物。可用于本发明的 UTC 组分和产物参见美国专利公布号 2005/0032209、2005/0058631 和 2005/0054098,并且它们通过引用结合到本文中。在任何情况下,药物组合物还可包含其它活性剂,例如本领域已知的抗炎药、抗凋亡剂、抗氧化剂、生长因子、肌肉营养因子或肌肉再生药或肌肉保护药。

[0107] 通常将包含 UTC 活细胞的药物组合物制成液体、半固体(例如凝胶)或固体(例如作为适于血管或肺组织工程改造的基质、支架等)。配制液体组合物用于通过本领域已知的任何可接受的途径给予,以实现将活细胞递送到靶标血管或肺组织中。通常这些包括通过给药途径以扩散方式或者靶向肺损伤、损害或损坏部位进行注射或输注,给药途径包括但不限于通过带针注射器和/或带或不带泵装置的导管,由肌内、静脉内或动脉内递送。

[0108] 通常配制在半固体或固体载体中包含活细胞的药物组合物用于手术植入到肺损伤、损害或损坏部位。应理解的是,还可通过手术给予液体组合物。在具体的实施方案中,半固体或固体药物组合物可包含可以是生物不能降解的或生物可降解的半渗透性凝胶、网格、细胞支架等。例如,在某些实施方案中,使外源细胞与其环境隔离,但仍能够使细胞分泌和递送生物分子(例如肌肉营养因子、血管营养因子或内皮祖细胞募集因子)到周围肺组织或血管细胞中可能是需要的或是适当的。在这些实施方案中,可将细胞配制成包含活的 UTC 或包含 UTC 的细胞群的自体植入物,自体植入物被物理分隔移植细胞与宿主组织的不可降解透性屏障包围。这类植入物有时亦称“免疫保护性的”,因为它们在缺乏药物诱导的免疫抑制时,具有防止免疫细胞和大分子杀死移植细胞的能力。

[0109] 在其它实施方案中,将各种不同的可降解凝胶和网状物(network)用于本发明的药物组合物。例如,特别适于缓释制剂的可降解材料包括生物相容性聚合物,例如聚乳酸、聚(乳酸乙醇酸共聚物)、甲基纤维素、透明质酸、胶原等。

[0110] 在其它实施方案中,在生物可降解的、优选生物再吸收的或生物可吸收的支架或基质表面上或者其中递送所述细胞可能是需要的或合适的。这些通常是三维的生物材料含有附着在支架上、分散在支架内或掺入包封在支架中的胞外基质中的活细胞。一旦植入机体的目标区域内,这些植入物便与宿主组织整合,其中移植细胞逐步建立。(参见例如 Tresco, P A 等, Adv. Drug Delivery Rev., 2000 ;42 :3-27 ;另参见 Hutmacher, D W,

J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 2001 ;12 :107-174)。

[0111] 生物相容性基质可由天然的、改良的天然或合成的生物可降解聚合物构成,包括均聚物、共聚物和嵌段共聚物及其组合。要注意的是,聚合物一般根据合成聚合物的单体命名。

[0112] 合适的生物可降解的聚合物或聚合物类别的实例包括血纤蛋白、胶原、弹性蛋白、明胶、玻连蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、凝血酶、聚氨基酸、氧化纤维素、原弹性蛋白、丝、核糖核酸、脱氧核糖核酸、蛋白质、多核苷酸、再生基底膜基质、淀粉、葡聚糖、藻酸盐、透明质酸酶、壳多糖、脱乙酰壳多糖、琼脂糖、多糖、透明质酸、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乙二醇、去细胞化组织、自组装肽、多肽、糖胺聚糖、它们的衍生物及其混合物。对于乙醇酸和乳酸两者,通常制备中间环状二聚体,并且在聚合前纯化。这些中间二聚体分别称为乙交酯和丙交酯。其它有益的生物可降解的聚合物或聚合物类别包括而限于脂肪族聚酯、聚亚烷基草酸酯、酪氨酸衍生聚碳酸酯、聚亚氨基碳酸酯、聚原酸酯、polyoxaesters、聚酰胺酯(polyamidoesters)、含有胺基的 polyoxaesters、聚亚丙基富马酸酯、聚二噁烷酮、聚碳酸酯、聚草酸酯、聚 α -羟酸、聚酯、聚氨酯、聚酯氨酯、聚醚氨酯、聚酐、聚乙酸酯、聚己酸内酯、聚(原酸酯)、聚氨基酸、聚酰胺及混合物和共聚物。其它有益的生物可降解聚合物包括而限于 L-乳酸和 D-乳酸的有规立构聚合物、双(对羧基苯氧基)丙烷和癸二酸的共聚物、癸二酸共聚物、己内酯共聚物、聚乳酸/聚乙醇酸/聚乙二醇共聚物、聚氨酯和聚乳酸的共聚物、 α -氨基酸共聚物、 α -氨基酸和己酸的共聚物、 α -苄基谷氨酸酯和聚乙二醇的共聚物、琥珀酸酯和聚二醇的共聚物、聚磷腈、聚羟基链烷酸酯及其混合物。还包括二元系和三元系。

[0113] 总的说来,用作基质的合适的生物可降解聚合物有良好的构型,使得生物可降解聚合物:(1) 具有适于既定用途的机械性能;(2) 保持足够完整,直到组织向内生长并愈合;(3) 不引起炎症或毒性反应;(4) 实现其用途后在体内代谢;(5) 容易加工成需要成型的所需要的最终产品;(6) 具有可接受的保存期限;和(7) 容易灭菌。

[0114] 在本发明的一个方面,用于形成基质的生物相容性聚合物为水凝胶的形式。总的说来,水凝胶是在水中可吸收其重量的 20% 以上,同时保持明显的三维结构的交联聚合材料。该定义包括在水性环境下可溶胀的无水交联聚合物以及水溶胀性材料。许多亲水聚合物可交联产生水凝胶,不论聚合物是生物来源的、半合成的、还是或完全合成的。水凝胶可由合成的聚合材料产生。这类合成聚合物可根据各种性质和可预测的批次间的一致性设计,并代表了一般无免疫原性顾虑的可靠的材料来源。基质可包括由自组装肽形成的水凝胶,例如美国专利号 5,670,483 和 5,955,343、美国专利申请号 2002/0160471 和 PCT 申请号 WO 02/062969 中论述的水凝胶。

[0115] 使水凝胶在递药应用中具有价值的性质包括平衡溶胀度、吸附动力学、溶质通透性及其体内性能特性。化合物的通透性部分取决于溶胀度或含水量和生物降解速率。由于凝胶的机械强度与溶胀度成正比地减弱,因此水凝胶可附在基材上使得复合系统的机械强度提高也完全在本发明的预期中。在一些实施方案中,水凝胶可渗入多孔基材内,从而获得基材的机械强度以及水凝胶的有益递送性质。

[0116] 可用于本发明的支架或基质(有时亦统称“构架”)的非限制性实例包括织物结构,例如织物、编结物、编织物、网状物、非织物和经编针织物(warped knits);多孔泡沫、半

多孔泡沫、穿孔薄膜或片层、微粒子、微珠和微球体和上述结构的组合的复合结构。例如，可使用以 VICRYL 缝合线 (Ethicon, Inc., Somerville, N. J.) 的商品名称销售的、合成可吸收的乙醇酸和乳酸 (PGA/PLA) 共聚物构成的纤维形成非织网垫 (mat)。还可使用由例如冷冻干燥或冻干方法 (参见美国专利申请 6,355,699) 制备的、由例如聚 (ϵ -己内酯)/聚乙醇酸 (PCL/PGA) 共聚物构成的泡沫。还可使用水凝胶例如自组装肽 (例如 RAD 16)。原位形成的可降解网状物也适用于本发明。(参见例如 Anseth, K S 等, J. Controlled Release, 2002 ;78 :199-209 ;Wang, D. 等, Biomaterials, 2003 ;24 :3969-3980 ;美国专利申请 2002/0022676)。将这些原位形成的材料配制成适于注射的液体,然后可通过各种方法,例如改变温度、pH 和原位或体内暴露于光,来诱导形成水凝胶。

[0117] 在另一个实施方案中,构架为由复丝组成的毛毡,复丝由生物可吸收的材料 (例如 PGA、PLA、PCL 共聚物或混合物或透明质酸) 制成。采用由卷、切、梳理、植针组成的标准织物加工技术将复丝制成毛毡。在另一个实施方案中,将细胞接种到可为复合结构的泡沫支架上。

[0118] 在许多上文提及的实施方案中,可将构架浇铸成有益的形状,例如血管形状。此外,应理解的是,可将 UTC 例如以相当于用于制备例如含有成纤维细胞的 GDC 血管内线圈的方式,在预成形的不可降解的手术装置或可植入装置上培养。(Marx, WF 等, Am. J. Neuroradiol, 2001 ;22 :323-333)。

[0119] 为了提高细胞附着,可在接种细胞前对基质、支架或装置进行处理。例如在接种前,尼龙基质可用 0.1 摩尔乙酸处理,并在聚赖氨酸、PBS 和 / 或胶原中温育以包覆尼龙。可同样地用硫酸处理聚苯乙烯。还可对构架的外表面进行改进以改善细胞的附着或生长和组织分化,例如用血浆包覆构架或者加入一种或多种蛋白质 (例如胶原、弹性纤维、网状纤维)、糖蛋白、糖胺聚糖 (例如硫酸肝素、4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角蛋白)、遗传物质 (例如细胞因子和生长因子)、细胞基质和 / 或其它材料,包括但不限于明胶、藻酸盐、琼脂、琼脂糖和植物树胶,尤其是影响细胞存活和分化的其它因子。

[0120] 按照本领域已知的方法制备含有 UTC 的构架。例如,可将细胞在培养瓶中随意地生长至亚融合或融合,从培养物中取出并接种到构架上。需要时,可在细胞接种以引发分化和组织形成之前、期间或之后将生长因子加入培养基中。或者,可对构架本身进行改进,从而促进细胞在其上面生长,或者使得降低排斥植入物的风险。因此,可将一种或多种生物活性化合物 (包括但不限于抗炎化合物、免疫抑制剂或生长因子) 加入构架用于局部释放。

[0121] 可以多种方式使用 UTC、UTC 的部分或包含 UTC 的细胞群、或 UTC 的组分或 UTC 产生的产物以支持和促进尤其是肺病患者的肺细胞和组织的修复、再生和改善、提高血流量并刺激和 / 或支持血管生成。这类用途包括体外、离体和体内方法。

[0122] 如上所述,在一个实施方案中,可体外培养 UTC 以产生生物产物,所述生物产物或是由细胞天然产生的,或是诱导分化成肺组织时由细胞产生的,或是由细胞通过遗传修饰产生的。例如发现生长在生长培养基中的脐衍生细胞分泌 TIMP1、TPO、KGF、HGF、FGF、HBEGF、BDNF、MIP1b、MCP1、RANTES、I309、TARC、MDC 和 IL-8。(参见实施例)。另外,内皮祖细胞募集的因子,例如 VEGF、SDF-1、EPO、G-CSF、他汀类、雌激素、PPAR- γ 和 CXCR4 可由 UTC 产生,并可分泌到生长培养基中。用于肺组织或血管修复和再生的尚未检测或未经研究的其它营养因子很可能由 UTC 产生,并可分泌到培养基中。

[0123] 在这一方面,本发明的另一个实施方案的特征在于将 UTC 用于产生条件培养液,由未分化的 UTC 或来在刺激分化成肺组织或血管谱系的条件下温育的 UTC 产生。例如,预期这类条件培养液用于肺组织前体细胞的体外或离体培养,或体内支持包含均质 UTC 群或包含 UTC 和肺组织或血管祖代的异质群的植入细胞,或将内皮祖细胞募集到肺损伤的部位。

[0124] 又一个实施方案包含将 UTC 细胞裂解物、其可溶性细胞部分或组分,或 ECM 或其组分用于各种目的。如上所述,这些组分的一些可用于药物组合物。在其它实施方案中,细胞裂解物或 ECM 用于包覆或以别的方式处理手术使用的、或用于植入、或用于离体目的物质或装置,以促进在这类治疗过程中所接触的细胞或组织的愈合或存活。在一些优选的实施方案中,由 UTC 制备的这类制品包含 FGF 和 HGF。

[0125] 在另一个实施方案中,UTC 有利地用于体外共培养以向其它细胞提供营养支持,特别是肺组织细胞,例如骨骼肌祖细胞、血管平滑肌细胞、血管平滑肌祖细胞、周细胞、血管内皮细胞或血管内皮祖细胞。在一些优选的实施方案中,营养支持为细胞增殖。对于共培养,最好在两种细胞类型接触的条件下,对 UTC 与所需要的其它细胞进行共培养。这可通过例如将作为异质细胞群的细胞接种到培养基中或接种到合适的培养基质上来实现。或者,可先使 UTC 生长至融合,然后用作第二种所需培养细胞类型的基质。在后一个实施方案中,可对细胞进行进一步的物理分隔,例如通过膜或类似装置,使得在共培养期后,可独立取出其它的细胞类型并使用。应用共培养 UTC 促进肺组织或血管细胞类型的扩增和分化可用于研究和临床/治疗领域。例如,可利用 UTC 共培养以促进肺组织的生长和分化,例如培养中的血管平滑肌、周细胞或血管内皮细胞用于例如基础性研究目的或用于药物筛选实验。UTC 共培养还可用于例如血管平滑肌、周细胞或血管内皮祖代的离体扩增,以用于随后给予的治疗目的。肺组织,例如血管平滑肌、周细胞或血管内皮祖细胞可从个体收获,在与 UTC 的共培养中离体扩增,然后再输回该个体(自体转移)或另一个体(同源或同种异体转移)。在这些实施方案中,应理解的是,在离体扩增后,可将包含 UTC 和肺组织(例如血管平滑肌、周细胞或血管内皮祖代)的混合细胞群给予需要治疗的患者。或者,在自体转移是适当的或需要的情况下,可物理分隔培养中的共培养细胞群,使得能够除去自体肺组织(例如血管平滑肌或血管内皮祖代)以给予患者。

[0126] 如美国专利申请号 2005/0032209、2005/0058631、2005/0054098 和 2005/0058630 中所述,已经证实,在公认的动物模型中,可将 UTC 及其组分和产物有效地移植到机体内,提高血流量,并减少组织坏死。这些研究发现以及本发明的发现,支持本发明的优选实施方案,其中将 UTC 用于细胞疗法从而通过修复或再生肺损伤患者的肺组织和/或血管组织,或者通过改善肺损伤患者的血流量或刺激和/或支持血管生成,来治疗肺损伤或损害。在一个实施方案中,将 UTC 移植到机体的目标位置,尤其是肺损伤位置或接近肺损伤位置,其中 UTC 可分化成一种或多种肺组织表型,例如血管平滑肌、周细胞或血管内皮表型,UTC 可为血管平滑肌细胞、周细胞或血管内皮细胞祖代和/或肺组织细胞等肺组织提供营养支持。UTC 可原位产生将内皮祖细胞募集到肺损伤部位的因子,或者 UTC 可以两种或更多种这些方式发挥有益作用。UTC 分泌营养因子,包括但不限于 GFGFm、IL-6、IL-8、HGF、IGF-1、TPO 等。UTC 可有助于血管祖细胞募集例如成血管细胞以刺激新的血管形成。

[0127] UTC 可在给予 UTC 的患者体内发挥营养作用。例如,UTC 可对肺组织细胞(例如其血管平滑肌细胞、血管内皮细胞、周细胞或祖细胞)发挥营养作用。在一些优选的实施方案

中,营养作用是这类细胞的增殖。UTC 还可在给予 UTC 的患者体内诱导细胞迁移。这类迁移可利于 COPD、ALI、ARDS 及肺纤维化等肺部疾病、病症和 / 或损伤的修复、再生和治疗。例如,在肺损害处或其附近给予 UTC 可诱导细胞迁移到肺损害处,从而使患病组织及其周围组织得到修复、再生或者治疗。如此给予的 UTC 可诱导肺组织细胞(例如其血管平滑肌细胞、血管内皮细胞、周细胞或祖细胞)的迁移。在优选的实施方案中,UTC 诱导血管内皮细胞和 / 或血管内皮祖细胞迁移至肺损害部位,或至少接近肺损害部位。在一些实施方案中,FGF 和 / 或 HGF 诱导或支持迁移,优选通过 UTC 表达的 FGF 和 HGF。由 UTC 制备的制品,包括细胞裂解物、亚细胞部分、产物等,还可用于治疗肺部疾病、病症和 / 或损伤。这类制品可用药理学上可接受的载体(例如本文描述和列举的载体)配制,并以有效治疗肺部疾病、病症和 / 或损伤的量给予患者。在优选的实施方案中,由 UTC 制备的制品包含 FGF 和 HGF。

[0128] 本发明具体的实施方案涉及直接修复、再生或置换或支持修复、再生或置换血管以治疗肺损伤或损害。

[0129] UTC 可单独给予(例如基本上是均质的 UTC 群)或与其它细胞混合给予。如上所述,UTC 可以用基质或支架,或者用常规药理学上可接受的载体配制的药物制剂给予。如果 UTC 与其它细胞一起给予,则 UTC 可与其它细胞一起同时给予或序贯(在其它细胞之前或之后)给予。可与 UTC 联合给予的细胞包括但不限于肌细胞、肺组织细胞、骨骼肌祖细胞、血管平滑肌细胞、血管平滑肌祖细胞、周细胞、血管内皮细胞、血管内皮祖细胞和 / 或其它多能或多潜能干细胞。不同类型的细胞可以在临给予前或给予前不久与 UTC 混合,或者可在给予前共培养一段时间。

[0130] UTC 可与其它有益的药物或生物分子或者其它活性剂一起给予,例如本领域已知的抗炎药、抗凋亡剂、抗氧化剂、生长因子、血管生成因子或者肌肉再生或肌肉保护药。当与其它药物一起给予时,UTC 可以单一药物组合物共同给予,或以单独的药物组合物与其它药物同时或序贯给予(在其它药物之前或之后给予)。其它药物可以是始于移植前并在整个康复过程中持续的治疗方案的一部分,或者可以是始于移植时,甚至移植后,只要本领域熟练医师认为适当时。

[0131] 在一个实施方案中,UTC 作为未分化细胞给予,即在生长培养基中培养时。或者,UTC 可以在培养中在暴露于刺激分化成所需肺组织表型(例如血管平滑肌、周细胞或血管内皮表型)的条件下以后给予。

[0132] 本发明的细胞可通过手术植入、注射、递送(例如通过导管、注射器、分流器、支架、微导管或泵),或以其它方式直接或间接给予肺损伤、损害或损坏的部位。本发明细胞或其组合物的给药途径包括但不限于静脉内、肌内、皮下、鼻内、鞘内、脑池内,或者通过带针注射器或带或不带泵装置的导管给予。

[0133] 如果以半固体或固体装置给予细胞,则手术植入机体的确切位置通常是给予的合适方式。然而,液体或液体药物组合物,可通过血液给予,或直接给予受累肺组织(例如遍及广泛的受累部位,例如可能是弥散性 ALI 或 ARDS 的情况)。化学信号、生长因子或钙蛋白酶可引导 UTC 的迁移。

[0134] 可通过微导管、内插管或通过微型泵将脐带组织衍生细胞或包含脐带组织衍生细胞的组合物和 / 或基质递送到所述部位。溶媒赋形剂或载体可以是任何已知的用于给予患者、特别是在诱导细胞分化的局部部位给予的药理学上可接受的赋形剂或载体。实例包括例

如 Dulbeccos 改良 Eagle 培养基 (DMEM)、无菌盐水、无菌磷酸缓冲盐溶液、Leibovitz 培养基 (L15, Invitrogen, Carlsbad, Calif.)、葡萄糖的无菌水溶液等液体培养基以及任何其它的生理学上可接受的液体。

[0135] 其它实施方案包括通过给予治疗组合物以治疗肺损伤或损害的方法,所述治疗组合物包含药学上可接受的载体和 UTC 细胞组分(例如细胞裂解物或其组分)或产物(例如由 UTC 天然产生的或通过遗传修饰产生的营养因子和其它生物因子、得自 UTC 培养物的条件培养液)或者 UTC 生长培养基或由生长培养基纯化的产物。在优选的实施方案中,生物因子是 FGF 和 HGF。这些方法还可包含给予其它活性剂,例如本领域已知的生长因子、血管生成因子或肌肉再生或肌肉保护药物。

[0136] 按照规范医疗实践,考虑个体患者的情况,例如因肺损害事件产生的损伤或损害的性质和程度、年龄、性别、体重和综合身体状况以及从业医生已知的其它因素,开发了给予本文所述的 UTC 或任何其它的治疗组合物或药物组合物的剂型和方案。因此,根据本领域已知的这些因素确定待给予患者的药物组合物的有效量。

[0137] 已经证实 UTC 在混合淋巴细胞反应中不刺激同种异体 PBMC。因此,在某些情况下,UTC 的同种异体移植,甚至异种移植是可以耐受的。在一些实施方案中,UTC 本身提供免疫抑制作用,从而防止植入的 UTC 的宿主排斥作用。在这种情况下,在细胞疗法期间可能不需要药物免疫抑制。

[0138] 然而,在其它情况下,在开始细胞疗法之前对患者进行药物免疫抑制可能是需要的或适当的。这可通过使用全身或局部免疫抑制剂来实现,或者可通过递送上述包封装置中的细胞来实现。降低或消除对移植细胞的免疫应答的这些方法和其它方法是本领域已知的。作为一种替代法,可如上所述对 UTC 进行遗传修饰以降低其免疫原性。

[0139] 可通过使用各种扫描技术确定生存患者中植入的 UTC 的存活情况,例如计算机控制轴向 X 线断层扫描术 (CAT 或 CT) 扫描、磁共振成像 (MRI) 或正电子发射断层摄影术 (PET) 扫描。还可以通过取出肺组织或血管组织,肉眼检查或通过显微镜检查来进行死后的移植物存活的测定。或者,可用对血管平滑肌细胞、周细胞或血管内皮细胞等肺组织细胞是特异性的染色剂处理细胞。也可通过之前掺入的示踪剂染料来鉴定移植细胞,例如罗丹明或荧光素标记的微球、坚牢蓝、铁微粒、双苯甲酰胺或以遗传方法掺入的报道基因产物,例如 β -半乳糖苷酶或 β -葡糖醛酸糖苷酶。

[0140] 另一方面,本发明提供药盒,所述药盒以如上所述各种方法使用 UTC、UTC 群、UTC 的组分和产物刺激和/或支持血管生成,改善血流量,使因肺损害事件损伤或损害的肺组织再生、修复和改善。如果用于治疗由肺部疾病、病症和/或损伤引起的损害或损伤,或其它计划的治疗,则药盒可包括一种或多种细胞群,包括至少 UTC 和药学上可接受的载体(液体、半固体或固体)。药盒也可任选包括给予细胞的方法,例如通过注射。药盒还可包括细胞的使用说明书。制备用于野战医院用途(例如军事用途)的药盒可包括整个手术供应品,包括组织支架、手术缝线等,其中细胞将与急性损伤的修复联用。用于本文所述的测定法和体外方法的药盒可包括以下的一种或多种:(1) UTC 或 UTC 的组分或产物,(2) 实施体外方法的试剂,(3) 其它细胞或细胞群(适当时),和 (4) 进行体外方法的说明书。

[0141] 下列实施例更详细地描述了本发明实施方案的若干方面。这些实施例旨在进一步说明本文所述的本发明的各方面。这些实施例不得解释为限制所列举的方面。

[0142] 实施例 1

[0143] 高氧诱发的急性肺损伤小鼠模型中的肺保护功效

[0144] 本实施例说明了在高氧诱发的肺损伤模型中人 UTC(hUTC) (hUTC 的分离和表征可参见实施例 5-15) 提高肺修复和再生的疗效。脐细胞培养与分离

[0145] 按照美国专利公布号 2005/0032209、2005/0058631 和 2005/0054098 所述方法制备脐衍生细胞 (UDC, hUTC)。将细胞培养至所需传代,然后低温保存。

[0146] 动物模型

[0147] 雌性 C57BL/6 小鼠 (7 周龄) 获自 Ace Animals (Boyertown, PA)。临注射前,将 hUTC 于 37℃ (水浴) 融化,在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中洗涤两次后,重新悬浮于 1mL 的 PBS 中。细胞用血细胞计数器计数。细胞存活率通过锥虫蓝染料排斥测定。以 1×10^6 个细胞的浓度将细胞在 200 μ l PBS 中复溶。

[0148] 研究要点概括于下表 1-1 中。在第 0 天,使用 1mL 注射器和 26 号针,通过静脉内尾静脉注射,将细胞 (1×10^6 个 hUTC 的 200 μ l PBS 溶液) 或 PBS 溶媒慢慢给予小鼠,然后,使动物暴露于室内空气或 90% O₂ 中。通过将动物放入已预处理和平衡至 90% O₂ 达 1 小时的 BioSpherix 槽 (BioSpherix, LTD, Lacona, NY) 内来实现暴露于 90% O₂ 中。每天给这些动物提供支持性护理 (加热支持和 NutriCal)。一天两次记录每个槽的动物观察结果、死亡、存活和氧气百分比浓度。治疗后第 4 天,使用 50mg/mL Nembutal (戊巴比妥) 将动物处以安乐死。

[0149] 表 1-1. 实验设计。

[0150]

治疗组	环境处理	治疗	动物数目
1	室内空气	PBS	12
2	90% O ₂	PBS	12
3	90% O ₂	1×10^6 个 hUTC	12

[0151] 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 总蛋白分析

[0152] 为了测定每个样品中的总蛋白,采用 BCA 蛋白质测定法 (Pierce) 对无细胞 BALF 进行了分析。应用 Softmax 4.0 程序完成了分析,数据应用 Graph Pad Prism 软件制图。

[0153] BALF 和肺匀浆物细胞因子 / 趋化因子分析

[0154] 为了制备 BALF,将每治疗组 6 只动物处以安乐死,将肺用 1.0mL 无菌 PBS (Invitrogen) 灌洗一次后,将试管放在湿冰上。

[0155] 将 BALF 以 1000rpm 离心 5 分钟,取出上清液,用于进一步分析。

[0156] 为了制备肺匀浆物,将每组 6 只动物处以安乐死,用 PBS 进行整体灌注后,切开左肺,放入在冰中的、装有裂解基质 D (Lysing Matrix D) 的试管中,然后在 FastPrep 仪器中以 4.0 的速率离心 40 秒钟。

[0157] 按照生产商的方案,采用小鼠 22- 多微珠试剂盒 (Millipore) 测定了 BALF 和肺匀浆上清液两者中的细胞因子 / 趋化因子水平,并用 BioRad Bioplex 机进行了分析。应用 GraphPad Prism 软件对结果制图并进行了分析。

[0158] 人细胞检测

[0159] 由 Asuragen, Inc. 按照公司的标准操作程序,从小鼠组织中分离出总 RNA。采用 NanoDrop ND-1000UV 分光光度计,通过在 260 和 280nm 下的吸光度读数,测定总 RNA 样品的纯度和量。采用 Agilent Bioanalyzer 对 RNA 完整性进行了评价。

[0160] 采用 GAPDH mRNA (Hs99999905_m1_GAPDH) 的人特异性测定法对小鼠肺组织内 hUTC 的数量进行了估算。由 Asuragen, Inc. 按照公司的标准操作程序,采用单管 TaqMan® 测定法 (Applied Biosystems) 进行了样品的定量 RT-PCR (qRT-PCR) 分析。按照生产商的说明书,采用 TaqMan® 高容量 cDNA 合成试剂盒 (Applied Biosystems),并在每个稀释液 20 微升的总反应体积中对总 RNA 的稀释液进行了反转录。然后通过 PCR 对 50ng 输入 cDNA 进行了分析。所有扩增以一式三份在有效的 ABI 7500 实时循环变温器中进行。在 95℃ 下温育 10 分钟后,使样品于 95℃ 15 秒钟扩增 40 次循环,然后 60℃ 1 分钟。根据分析已知量的纯化 hUTC 总 RNA 而制成的标准曲线,估算小鼠肺内 hUTC 的总数。

[0161] BALF 总蛋白

[0162] 与室内空气对照动物相比,暴露于 90% O₂ 达 4 天引起 BALF 的总蛋白含量增加 (p < 0.01,图 1,表 1-2)。此外,与 90% O₂PBS 治疗组相比,在 90% O₂hUTC 治疗组中,BALF 总蛋白统计显著性地降低 (p < 0.05)。

[0163] 表 1-2. BALF 总蛋白浓度 :采用 Pierce BCA 蛋白质测定法测定总蛋白。

[0164]

治疗组	动物数目	BALF 总蛋白浓度(μg/dl)
1	1	401.89
1	2	1006.68
1	3	660.67
1	4	494.49
1	5	1432.64
1	6	76.23
平均值:		678.77
标准误差:		437.77

[0165]

治疗组	动物数目	BALF 总蛋白浓度(μg/dl)
2	1	1701.60
2	2	1438.46
2	3	1197.13
2	4	2823.95
2	5	4482.76
2	6	3174.32
平均值:		2469.70
标准误差:		1260.74

[0166]

治疗组	动物数目	BALF 总蛋白浓度(μg/dl)
3	1	984.87
3	2	691.20
3	3	1172.41
3	4	893.28
3	5	695.56
3	6	1359.95
平均值:		966.21
标准误差:		265.37

[0167] BALF 和肺匀浆物细胞因子分析

[0168] 与用 PBS 溶媒治疗并暴露于 90% O₂ 的动物相比,在用 hUTC 治疗并暴露于 90% O₂ 的动物中观察到 BALF 角质形成细胞因子 (KC)、γ 干扰素诱导性细胞因子 (IP-10)、白介素 1 α (IL-1 α) 和肺匀浆物单核细胞趋化因子 -1 (MCP-1) 呈统计显著性降低 (p < 0.02)。(图 2a 和图 2b,图 3 和图 4)。

[0169] 人细胞移入

[0170] 在治疗后的第 4 天,处死动物,收获肺,分离总 RNA 用于人细胞检测。结果表明在 hUTC 治疗的动物肺内存在 hUTC,但在 PBS 治疗的动物的肺中无 hUTC(表 1-3)。

[0171] 表 1-3. 人细胞检测。采用实时 PCR 测定人特异性 GAPDH mRNA 转录物,来测定治疗后的第 4 天小鼠肺内 hUTC 的存在。小于 34 的循环阈 (CT) 值表明小鼠肺组织内存在 hUTC。在小鼠肺组织内未检测到 hUTC mRNA 转录物 (缺乏)。在小鼠肺组织内检测到 hUTC mRNA 转录物 (存在)。

[0172]

治疗组	平均 CT 值	小鼠肺内的 hUTC
1	36.1	缺乏
1	36.5	缺乏
2	34.9	缺乏
2	34.4	缺乏
3	26.2	存在
3	29.6	存在
3	26.6	存在
3	26.9	存在
3	26.1	存在
3	26.5	存在

[0173] 评价了预防性静脉内给予 hUTC 对小鼠高氧诱发性急性肺损伤发生的作用。在给予小鼠的 hUTC 暴露于 90% O₂ 后, BALF 的总蛋白水平降低, 表明 hUTC 能够减少肺部高氧诱发性血管渗漏 / 水肿。另外, 数据表示, hUTC 引起 3 种重要趋化因子水平降低, 表明了肺部炎症减轻。这些数据为 hUTC 可能是肺病治疗的重要治疗药物提供了证据。

[0174] 实施例 2

[0175] 慢性阻塞性肺病啮齿动物模型中的治疗功效

[0176] 本实施例说明了 hUTC 在香烟烟雾诱发性肺损伤啮齿动物模型中促进肺修复和再生的疗效。数据表明 hUTC 用于预防性治疗 COPD 的治疗价值。

[0177] 脐细胞培养与分离

[0178] 按照美国专利公布号 2005/0032209、2005/0058631 和 2005/0054098 所述方法制备脐衍生细胞 (UDC, hUTC)。将细胞培养至所需传代, 然后低温保存。

[0179] 动物模型

[0180] 健康雄性, 12-15 周龄, SH 大鼠可购自 Charles River Laboratories, Raleigh, NC。按体重将各大鼠品系随机分成 3 组 (表 2-1)。然后将 SD 大鼠整体暴露于烟草烟雾 (微粒子总浓度 75-85mg/m³) 或过滤的室内空气中 6 小时 / 天达 15 天 (3 天 / 周)。

[0181] 给药准备

[0182] 在第 15 天, 终止烟雾处理, 并给予 hUTC 或 PBS 溶媒。临注射前, 将 hUTC 在 37℃ (水浴) 融化, 在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中洗涤 2 次后, 重新悬浮于 1mL 的 PBS 中。细胞用血细胞计数器计数。细胞存活率可通过锥虫蓝染料排斥测定。将细胞以 1e⁶ 个细胞和 3e⁶ 个细胞的适当浓度在 2mL PBS 中复溶。在 2 分钟内通过尾静脉注射慢慢给予细胞。

[0183] 在溶媒或 hUTC 注射后 2 周, 处死动物, 以收获支气管肺泡灌洗液 (BALF) (8 只动物 / 治疗组) 和肺组织 (8 只动物 / 治疗组)。

[0184] 表 2-1. 实验设计。

[0185]

治疗组	大气	给药时间	治疗
1	室内空气	0	PBS
2	烟雾	0	PBS
3	烟雾	0	1e ⁶ hUTC
4	烟雾	0	3e ⁶ hUTC

[0186] BALF 制备

[0187] 为了制备 BALF, 将每治疗组 8 只动物处以安乐死, 用 1.0mL 无菌 PBS (Invitrogen) 灌洗肺一次, 将装有新鲜 BALF 的管放在湿冰上。以 1000rpm 将 BALF 离心 5 分钟, 然后取出上清液并用于进一步分析。

[0188] BALF 细胞因子分析

[0189] 按照生产商的方案,采用小鼠 22-多微珠试剂盒 (Millipore) 测定 BALF 细胞因子/趋化因子水平,并可用 BioRad Bioplex 机进行分析。结果可应用 GraphPad Prism 软件制图并分析。

[0190] BALF 总蛋白分析

[0191] 为了测定每个样品中的总蛋白,可采用 BCA 蛋白质测定法 (Pierce) 对不含细胞的 BALF 进行分析。可应用 Softmax 4.0 程序完成分析,数据可应用 Graph Pad Prism 软件制图。

[0192] 组织学

[0193] 从每治疗组 8 只动物中收获肺。每个肺的一半用 10% 甲醛中性缓冲溶液固定 24 小时,在逐级乙醇系列中脱水,在石蜡中包埋,并按 5 μ m 切片。石蜡切片用苏木精-伊红 (HE) 和 Masson 染色以进行组织病理学分析。将剩下的一半肺速冻并加工用于 MPO 和人细胞检测 (见下文)。

[0194] 髓过氧化物酶 (MPO) 活性

[0195] 将约 200mg 的右上叶肺组织在 20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.4) 中匀浆,并超速离心。用 HTAB 将沉淀保存于 -70°C 下用于 MPO 测定。然后可测定 MPO 活性。

[0196] RNA 分离

[0197] 可由 Asuragen, Inc. 按照公司的标准操作程序,从全部速冻肺组织中提取总 RNA。可采用 NanoDrop ND-1000UV 分光光度计,通过在 260 和 280nm 下的吸光度读数测定总 RNA 样品的纯度和量。可采用 Agilent Bioanalyzer 评价 RNA 完整性。

[0198] 人细胞检测

[0199] 可采用 GAPDH mRNA (Hs99999905_m1 GAPDH) 的人特异性测定法估算小鼠肺组织内 hUTC 的数量。可由 Asuragen, Inc. 按照公司的标准操作程序,使用单管 TaqMan® 测定法 (Applied Biosystems) 进行样品的定量 RT-PCR (qRT-PCR) 分析。按照生产商的说明书,在每个稀释液 20 微升的总反应体积中,采用 TaqMan® 高容量 cDNA 合成试剂盒 (Applied Biosystems) 使总 RNA 的稀释液反转录。然后可通过 PCR 分析 50ng 输入 cDNA。所有扩增将以一式三份在有效的 ABI 7500 实时循环变温器中进行。在 95°C 下温育 10 分钟后,可将样品于 95°C 15 秒钟扩增 40 次循环,然后 60°C 1 分钟。

[0200] 实施例 3

[0201] 肺纤维化啮齿动物模型中的肺保护和抗纤维化作用

[0202] 本实施例说明了在博来霉素 (BLM) 诱发性肺纤维化啮齿动物模型中,hUTC 预防纤维化和提高肺修复和再生的疗效。

[0203] 脐细胞培养与分离。按照美国专利公布号 2005/0032209、2005/0058631 和 2005/0054098 所述方法制备脐衍生细胞 (UDC, hUTC)。将细胞培养至所需传代,然后低温保存。

[0204] 动物模型

[0205] 获取 64 只成年 Sprague-Dawley 大鼠 (体重 200-250g),并随机分成 4 个组,每组 16 只大鼠。用 5mg/kg BLM 从气管内灌注动物。临注射前,可将 hUTC 在 37°C (水浴) 融化,在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中洗涤 2 次后,重新悬浮于 1mL 的 PBS 中。细胞用血细胞计数器计数。细胞存活率可通过锥虫蓝染料排斥测定。可以合适的浓度将细胞在 2mL PBS 中复

溶。在 2 分钟内通过尾静脉注射慢慢给予细胞。研究设计概括于下表 3-1 中。

[0206] 在 hUTC 治疗组中,在 BLM 灌注后 12 小时,将 0.1-x10⁶、1x10⁶ 或 3x10⁶ 个 hUTC 注射到尾静脉中。可按与 hUTC 治疗组的类似方式只给予 PBS 溶媒。在溶媒或 hUTC 注射后 2 周,处死动物,收获支气管肺泡灌洗液 (BALF) (8 只动物 / 治疗组) 和肺组织 (8 只动物 / 治疗组)。

[0207] 表 3-1. 实验设计。

[0208]

治疗组	BLM(mg/kg)	治疗
1	5	PBS
2	5	0.1e ⁶ hUTC
3	5	1e ⁶ hUTC
4	5	3e ⁶ hUTC

[0209] BALF 制备

[0210] 为了制备 BALF,将每治疗组 8 只动物处以安乐死,用 1.0mL 无菌 PBS(Invitrogen) 灌洗肺一次,将装有新鲜 BALF 的管放在湿冰上。以 1000rpm 将 BALF 离心 5 分钟,取出上清液,并用于进一步分析。

[0211] BALF 细胞因子分析

[0212] 按照生产商的方案,采用小鼠 22- 多微珠试剂盒 (Millipore) 测定 BALF 细胞因子 / 趋化因子水平,并可用 BioRad Bioplex 机进行分析。结果可应用 GraphPad Prism 软件制图并分析。

[0213] BALF 总蛋白分析

[0214] 为了测定每个样品中的总蛋白,可采用 BCA 蛋白质测定法 (Pierce) 对不含细胞的 BALF 进行分析。可应用 Softmax 4.0 程序完成分析,而数据可应用 Graph Pad Prism 软件制图。

[0215] 组织学

[0216] 从每治疗组 8 只动物中收获肺。每个肺的一半用 10% 甲醛中性缓冲溶液固定 24 小时,在逐级乙醇系列中脱水,在石蜡中包埋,并接 5 μm 切片。石蜡切片用苏木精 - 伊红 (HE) 和 Masson 染色以进行组织病理学分析。将剩下的一半肺速冻并加工用于人细胞检测 (见下文)。

[0217] 人细胞检测

[0218] 由 Asuragen, Inc. 按照公司的标准操作程序,从全部速冻肺组织中提取总 RNA。可采用 NanoDrop ND-1000UV 分光光度计,通过在 260 和 280nm 下的吸光度读数测定总 RNA 样品的纯度和量。可采用 Agilent Bioanalyzer 评价 RNA 完整性。

[0219] 采用 GAPDH mRNA (Hs99999905_m1 GAPDH) 的人特异性测定法估算小鼠肺组织内 hUTC 的数量。可由 Asuragen, Inc. 按照公司的标准操作程序,使用单管 TaqMan®测定法 (Applied Biosystems) 进行样品的定量 RT-PCR(qRT-PCR) 分析。按照生产商的说明书,

在每个稀释液的 20 微升总反应体积中,采用 TaqMan®高容量 cDNA 合成试剂盒 (Applied Biosystems) 使总 RNA 的稀释液反转录。然后可通过 PCR 分析 50ng 输入 cDNA。所有扩增将以一式三份在有效的 ABI 7500 实时循环变温器中进行。在 95℃ 下温育 10 分钟后,可将样品于 95℃ 15 秒钟扩增 40 次循环,然后 60℃ 1 分钟。

[0220] 实施例 4

[0221] 弹性蛋白酶诱发性肺气肿啮齿动物模型中的肺保护功效

[0222] 本研究证实啮齿动物模型中静脉内给予 hUTC 在治疗、改善和 / 或预防弹性蛋白酶诱发性肺气肿中的功效。

[0223] C57BL/6N 小鼠或大鼠可用乙醚或腹膜内注射氯胺酮 (90mg/kg) 和赛拉嗪 (1mg/kg) 麻醉,并鼻内给予 0.3 或 1.2 单位的猪胰弹性蛋白酶 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U. S. A)。对照小鼠可只接受鼻内给予盐水。

[0224] 在弹性蛋白酶处理后 2-24 小时,可通过尾静脉注射,给予浓度递增的人脐组织衍生细胞 (hUTC)。如表 4.1 中所述,可按 200 μ l 的总体积给予 0.1×10^6 、 1×10^6 或 3×10^6 个在 PBS 溶媒中复溶的 hUTC。按与 hUTC 治疗组的类似方式,给予不含 hUTC 的 PBS 溶媒。在溶媒或 hUTC 注射后 2 周,处死动物,收获肺组织样品和支气管肺泡灌洗液 (BALF),在分析前将其保存于 -70℃。

[0225] 表 4.1. 实验设计。

[0226]

治疗组	治疗
1	PBS
2	0.1×10^6 hUTC
3	1×10^6 hUTC
4	3×10^6 hUTC

[0227] BALF 分析

[0228] 为了制备 BALF,将全部动物处以安乐死,用 1.0mL 无菌 PBS (Invitrogen) 灌洗肺一次,并将管放在湿冰上。以 1000rpm 将 BALF 离心 5 分钟,取出上清液并用于进一步分析。

[0229] 按照生产商的方案,采用小鼠 22- 多微珠试剂盒 (Millipore) 测定 BALF 和肺匀浆上清液两者中的细胞因子 / 趋化因子水平,并用 BioRad Bioplex 机进行分析。结果可应用 GraphPad Prism 软件制图并分析。

[0230] BALF 总蛋白分析

[0231] 为了测定每个样品中的总蛋白,可采用 BCA 蛋白质测定法 (Pierce) 对不含细胞的 BALF 进行分析。可应用 Softmax 4.0 程序完成分析,而数据可应用 Graph Pad Prism 软件制图。

[0232] 组织学

[0233] 肺组织样品用 10% 甲醛中性缓冲溶液固定 24 小时,在逐级乙醇系列中脱水,在石蜡中包埋,并按 5 μ m 切片。石蜡切片用苏木精伊红 (H&E) 和 Masson 染色以进行组织病理

学分析。

[0234] 人细胞检测

[0235] 由 Asuragen, Inc. 按照公司的标准操作程序,从小鼠组织分离出总 RNA。可采用 NanoDrop ND-1000UV 分光光度计,通过在 260 和 280nm 下的吸光度读数测定总 RNA 样品的纯度和量。可采用 Agilent Bioanalyzer 评价 RNA 完整性。

[0236] 可采用 GAPDH mRNA(Hs99999905_m1 GAPDH) 的人特异性测定法估算小鼠肺组织内 hUTC 的数量。由 Asuragen, Inc. 按照公司的标准操作程序,使用单管 TaqMan®测定法 (Applied Biosystems) 进行样品的定量 RT-PCR(qRT-PCR) 分析。按照生产商的说明书,在每个稀释液的 20 微升总反应体积中,采用 TaqMan®高容量 cDNA 合成试剂盒 (Applied Biosystems) 使总 RNA 的稀释液反转录。然后可通过 PCR 分析 50ng 输入 cDNA。所有扩增将以一式三份在有效的 ABI 7500 实时循环变温器中进行。在 95℃ 下温育 10 分钟后,可将样品于 95℃ 15 秒钟扩增 40 次循环,然后 60℃ 1 分钟。可根据通过分析已知的纯的 hUTC 总 RNA 的量而制成的标准曲线,估算小鼠肺内 hUTC 的总数。

[0237] BALF 总蛋白

[0238] 与溶媒对照治疗动物相比,在 hUTC 治疗动物中可观察到 BALF 总蛋白浓度呈统计显著性下降。另外,有可能的是,在 PBS 对照动物中可观察到大量的嗜中性粒细胞蓄积,但在 hUTC 治疗组中却下降。

[0239] BALF 细胞因子 / 胞外基质蛋白分析

[0240] 与溶媒对照治疗动物相比,在 hUTC 治疗动物中观察到促纤维化和 / 或促炎细胞因子呈统计显著性下降。另外,弹性蛋白酶将提高支气管肺泡灌洗液中 ECM 的含量,一种肺损伤的标志。通过 hUTC 治疗可减弱这些作用。

[0241] 组织学分析

[0242] 弹性蛋白酶处理将引起包括大部分肺实质的胸膜下区域炎症的发生。另外,可观察到丢失正常肺泡和支气管结构以及血管系统。在用弹性蛋白酶攻击后不久给予 hUTC 可降低肺内炎症和损害的程度,其证据是具有正常肺泡结构的大面积未受损组织。

[0243] 人细胞移入

[0244] 在 hUTC 治疗啮齿动物的肺内可检测到人细胞,但 PBS 溶媒治疗的动物缺乏人细胞。

[0245] 实施例 5

[0246] 细胞的分离

[0247] 脐细胞分离。脐带获自 National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA)。在正常递送后获得该组织。在层流罩超净台中以无菌方式进行了细胞分离方案。在 100 单位 / 毫升的青霉素、100 毫克 / 毫升的链霉素和 0.25 微克 / 毫升的两性霉素 B (Invitrogen Carlsbad, CA) 存在下,将脐带在磷酸缓冲盐溶液 (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) 中洗涤,以除去血液和碎片。然后在 150cm² 组织培养皿中,在 50 毫升培养基 (DMEM-低葡萄糖或 DMEM-高葡萄糖; Invitrogen) 的存在下对组织进行机械分离,直到将组织切碎成精细浆。将切碎的组织转移到 50 毫升锥形管中 (每管约 5 克组织)。

[0248] 然后将组织在 DMEM-低葡萄糖培养基或 DMEM-高葡萄糖培养基中消化,培养基各含有 100 单位 / 毫升的青霉素、100 毫克 / 毫升的链霉素、0.25 微克 / 毫升的两性霉素 B 和消

化酶。在一些实验中,使用胶原酶和分散酶的酶混合物(“C:D”)(胶原酶(Sigma, St Louis, MO), 500 单位/毫升;分散酶(Invitrogen), 50 单位/毫升, DMEM-低葡萄糖培养基中)。在其它实验中,使用胶原酶、分散酶和透明质酸酶的混合物(“C:D:H”)(C:D:H=胶原酶, 500 单位/毫升;分散酶, 50 单位/毫升;透明质酸酶(Sigma), 5 单位/毫升, DMEM-低葡萄糖中)。将装有组织、培养基和消化酶的锥形管以 225rpm 在定轨摇床(Environ, Brooklyn, NY)上于 37℃温育 2 小时。

[0249] 消化后,将组织以 150xg 离心 5 分钟,吸出上清液。将沉淀重新悬浮于 20 毫升生长培养基(DMEM:低葡萄糖(Invitrogen)、15% (v/v) 胎牛血清(FBS;特级胎牛血清;批号 AND18475;Hyclone, Logan, UT)、0.001% (v/v) 2-巯基乙醇(Sigma)、100 单位/毫升的青霉素、100 微克/毫升的链霉素和 0.25 微克/毫升的两性霉素 B(分别得自 Invitrogen, Carlsbad, CA))中。使细胞悬液通过 70 微米尼龙 BD FALCON 细胞渗滤器(BD Biosciences, San Jose, CA)过滤。使包含生长培养基的另外的 5 毫升漂洗液通过渗滤器。然后使细胞悬液通过 40 微米尼龙细胞渗滤器(BD Biosciences, San Jose, CA),并用另外 5 毫升生长培养基的漂洗液冲洗。

[0250] 使滤液重新悬浮于生长培养基(总体积 50 毫升)中,以 150xg 离心 5 分钟。吸出上清液后,将细胞重新悬浮于 50 毫升新鲜生长培养基中。再重复该步骤两次。

[0251] 在最后的离心之后,吸出上清液,将细胞沉淀重新悬浮于 5 毫升新鲜生长培养基中。用锥虫蓝染色测定活细胞数。然后把细胞在标准条件下培养。

[0252] 将由脐带组织分离的细胞以 5,000 个细胞/cm² 接种到明胶包被的 T-75 培养瓶(Corning Inc., Corning, NY)的生长培养基中。2 天后,耗尽培养基,并从培养瓶中吸出未贴壁的细胞。贴壁细胞用 PBS 洗涤 3 次除去碎片和血液衍生细胞。然后细胞用生长培养基补充,并允许生长至融合(从传代 0 到传代 1 约 10 天)。在随后的传代中(从传代 1 到传代 2 等),细胞在 4-5 天内达到亚融合(75-85%融合)。对于这些后续传代,以 5,000 个细胞/cm² 接种细胞。使细胞在具有 5%二氧化碳的潮湿培养箱中于 37℃生长。

[0253] 在一些实验中,在用 LIBERASE(2.5 毫克/毫升, Blendzyme 3;Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN)和透明质酸酶(5 单位/毫升, Sigma)消化后,由 DMEM-低葡萄糖培养基中的产后组织分离出细胞。组织消化和细胞分离与上述其它蛋白酶消化一样,只是使用 LIBERASE/透明质酸酶混合物而不是 C:D 或 C:D:H 酶混合物。用 LIBERASE 的组织消化导致细胞群从容易扩增的产后组织中分离出来。

[0254] 对使用不同的酶组合从脐带分离细胞的方法进行了比较。受到比较的用于消化的酶包括:i) 胶原酶;ii) 分散酶;iii) 透明质酸酶;iv) 胶原酶:分散酶混合物(C:D);v) 胶原酶:透明质酸酶混合物(C:H);vi) 分散酶:透明质酸酶混合物(D:H);和 vii) 胶原酶:分散酶:透明质酸酶混合物(C:D:H)。观察了细胞分离中使用这些不同的酶消化条件的差异(表 5-1)。

[0255] 还进行了其它尝试以便通过不同的方法由脐带分离细胞群。在一个实例中,将脐带切片,用生长培养基洗涤以去除血凝块和凝胶状物质。收集血液、凝胶状物质和生长培养基的混合物,并以 150xg 离心。将沉淀重新悬浮,并接种到明胶包被的培养瓶的生长培养基中。从这些实验分离出容易扩增的细胞群。

[0256] 还从得自 NDRI 的脐带血样品中分离出细胞。所采用的分离方案是 Ho 等人的国际

专利申请 PCT/US2002/029971 的分离方案。将脐带血 (NDRI, Philadelphia PA) 样品 (分别为 50 毫升和 10.5 毫升) 与裂解缓冲液 (过滤除菌的 155 毫摩尔氯化铵、10 毫摩尔碳酸氢钾、缓冲至 pH 7.2 的 0.1 毫摩尔 EDTA (所有组分来自 Sigma, St. Louis, MO)) 混合。按 1 : 20 脐带血 : 裂解缓冲液的比率使细胞裂解。将所得细胞悬液涡旋混合 5 秒钟, 并于环境温度温育 2 分钟。将裂解物离心 (在 200xg 下 10 分钟)。将细胞沉淀重新悬浮于含有 10% 胎牛血清 (Hyclone, Logan UT)、4 毫摩尔谷氨酰胺 (Mediatech Herndon, VA)、100 单位 / 毫升的青霉素和 100 微克 / 毫升的链霉素 (Gibco, Carlsbad, CA) 的完全最小必需培养基 (Gibco, Carlsbad CA) 中。将重新悬浮的细胞离心 (在 200xg 下 10 分钟), 吸出上清液, 将细胞沉淀在完全培养基中洗涤。把细胞直接接种在 T75 培养瓶 (Corning, NY)、T75 层粘连蛋白包被的培养瓶或 T175 纤连蛋白包被的培养瓶 (both Becton Dickinson, Bedford, MA) 中。

[0257] 为了确定细胞群是否能够在不同条件下分离, 并且在分离之后立即在各种条件下扩增, 按照上文提供的方法, 采用 C:D:H 的酶组合, 细胞在含或不含 0.001% (v/v) 2-巯基乙醇 (Sigma, St. Louis, MO) 的生长培养基中消化。使所有细胞在 100 单位 / 毫升的青霉素和 100 微克 / 毫升的链霉素存在下生长。在所有测试条件下, 在传代 0 和传代 1 之间细胞充分贴壁并扩增 (表 5-2)。证实了条件 5-8 和 13-16 中的细胞在接种后增殖良好高达 4 次传代, 此时将其低温冷藏。

[0258] C:D:H 的组合在分离后提供最佳细胞产量, 并在培养中产生比其它条件扩增更多子代的细胞 (表 5-1)。仅使用胶原酶或透明质酸酶, 无法得到可扩增的细胞群。未进行尝试确定该结果是否对测试的胶原酶是特异性的。

[0259] 表 5-1 : 使用不同的酶组合从脐带组织分离细胞

[0260]

酶消化	分离的细胞	细胞扩增
胶原酶	X	X
分散酶	+(> 10 小时)	+
透明质酸酶	X	X
胶原酶 : 分散酶	++(< 3 小时)	++
胶原酶 : 透明质酸酶	++(< 3 小时)	+
分散酶 : 透明质酸酶	+(> 10 小时)	+
胶原酶 : 分散酶 : 透明质酸酶	+++ (< 3 小时)	+++

[0261] 注释 : + = 好, ++ = 非常好, +++ = 优秀, X = 不成功

[0262] 在测试酶消化和生长的全部条件下, 细胞在传代 0 和传代 1 之间贴壁和扩增良好 (表 5-2)。实验条件 5-8 和 13-16 中的细胞在接种后增殖良好高达 4 次传代, 此时将其低温冷藏。将所有细胞均低温保存以进一步分析。

[0263] 表 5-2 :在不同条件下产后细胞的分离和培养扩增 :

[0264]

条件	培养基	15% FBS	BME	明胶	20% O ₂	生长因子
1	DMEM-Lg	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-Lg	Y	Y	Y	N(5%)	N
3	DMEM-Lg	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-Lg	Y	Y	N	N(5%)	N
5	DMEM-Lg	N(2%)	Y	N(层粘连蛋白)	Y	EGF/FGF(20ng/ml)
6	DMEM-Lg	N(2%)	Y	N(层粘连蛋白)	N(5%)	EGF/FGF(20ng/ml)
7	DMEM-Lg	N(2%)	Y	N(纤连蛋白)	Y	PDGF/VEGF
8	DMEM-Lg	N(2%)	Y	N(纤连蛋白)	N(5%)	PDGF/VEGF
9	DMEM-Lg	Y	N	Y	Y	N
10	DMEM-Lg	Y	N	Y	N(5%)	N
11	DMEM-Lg	Y	N	N	Y	N
12	DMEM-Lg	Y	N	N	N(5%)	N
13	DMEM-Lg	N(2%)	N	N(层粘连蛋白)	Y	EGF/FGF(20ng/ml)
14	DMEM-Lg	N(2%)	N	N(层粘连蛋白)	N(5%)	EGF/FGF(20ng/ml)
15	DMEM-Lg	N(2%)	N	N(纤连蛋白)	Y	PDGF/VEGF
16	DMEM-Lg	N(2%)	N	N(纤连蛋白)	N(5%)	PDGF/VEGF

[0265] 有核细胞贴壁并快速生长。这些细胞用流式细胞术进行了分析,且类似于通过酶消化获得的细胞。

[0266] 制备物含有红细胞和血小板。在头 3 周内无有核细胞贴壁和分裂。在接种后 3 周更换培养基,未观察到细胞贴壁和生长。

[0267] 可使用酶组合胶原酶(金属蛋白酶)、分散酶(中性蛋白酶)和透明质酸酶(分解透明质酸的黏液溶解酶),有效地从脐组织分离出细胞群。还可以使用 LIBERASE,这是一种胶原酶和中性蛋白酶的混合物。Blendzyme 3(其是胶原酶(4Wunsch 单位/克)和嗜热菌蛋白酶(1714 酪蛋白单位/克))也与透明质酸酶一起使用以分离细胞。这些细胞当在明胶包被的塑料器皿中的生长扩增培养基中培养时,容易扩增许多传代。

[0268] 还从脐带的残留血液（但不是脐带血）中分离出细胞。从组织洗涤的血凝块中存在的细胞，其在所采用的条件下贴壁和生长，可能是由于在解离过程中释放的细胞造成的。

[0269] 实施例 6

[0270] 细胞的生长特性

[0271] 将脐衍生细胞的细胞扩增潜力与其它的分离干细胞群进行了比较。细胞扩增到衰老的过程称为 Hayflick 极限。(Hayflick, L, J. Am. Geriatr. Soc., 1974; 22(1): 1-12; Hayflick, L, Gerontologist, 1974; 14(1): 37-45)。

[0272] 在室温下，将 20 毫升 2% (w/v) 明胶 (B 型: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) 加入 T75 培养瓶 (Corning Inc., Corning, NY) 中为时 20 分钟，来包被组织培养塑料瓶。在除去明胶溶液后，加入 10 毫升磷酸缓冲盐溶液 (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA)，然后吸出。

[0273] 使用下列细胞群对生长扩增潜力进行了比较; i) 间充质干细胞 (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) 脂肪衍生细胞 (美国专利号 6, 555, 374B 1; 美国专利申请 US20040058412); iii) 正常真皮成纤维细胞 (cc-2509 批号 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); 和 iv) 脐衍生细胞。最初将细胞以 5,000 个细胞/cm² 接种在明胶包被的 T75 培养瓶的生长培养基中。对于随后的传代，如下处理细胞培养物。在胰蛋白酶消化后，用锥虫蓝染色后计数活细胞。将细胞悬液 (50 微升) 与锥虫蓝 (50 微升, Sigma, St. Louis MO) 混合。用血细胞计数器估算活细胞数。

[0274] 计数后，将细胞以 5,000 个细胞/cm² 接种在明胶包被的 T75 培养瓶的 25 毫升新鲜生长培养基中。使细胞于 37°C 生长在标准大气 (5% 二氧化碳 (v/v)) 下。每周两次更换生长培养基。当细胞达到约 85% 融合时，使细胞传代; 重复该过程直到细胞达到衰老。

[0275] 在每次传代时，细胞均用胰蛋白酶消化并计数。计算活细胞产量、群体倍增数 [$\ln(\text{最终细胞} / \text{初始细胞}) / \ln 2$] 和倍增时间 (培养时间 / 群体倍增数)。为了测定最佳细胞扩增，将前一传代的总产量乘以每次传代的扩增系数求出每次传代的细胞总产量 (即 扩增系数 = 最终细胞 / 初始细胞)。

[0276] 还测定了在传代 10 时累积的细胞扩增潜力。采用了不同配置的条件。测定了正常真皮成纤维细胞 (cc-2509 批号 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD) 和脐衍生细胞。这些细胞群之前在传代到第 10 代时收集，每次传代细胞均培养生长到 5,000 个细胞/cm²。将传代 10 的细胞融化后，测定了细胞密度对细胞群的作用。将细胞在标准条件下融化并用锥虫蓝染色进行了计数。然后，将融化细胞以 1,000 个细胞/cm² 接种在生长培养基中。使细胞在标准大气条件下于 37°C 生长。一周两次更换生长培养基。在细胞达到约 85% 融合时，使细胞传代。随后使细胞传代直到衰老，即直到细胞无法再进一步扩增。每次传代时，细胞均用胰蛋白酶消化并计数。计算细胞产量、群体倍增数 ($\ln(\text{最终细胞} / \text{初始细胞}) / \ln 2$) 和倍增时间 (培养时间 / 群体倍增数)。将前一传代的总产量乘以每次传代的扩增系数求出每次传代的细胞总产量 (即 扩增系数 = 最终细胞 / 初始细胞)。

[0277] 在另一项实验中，测定了在低水平细胞接种条件下新鲜分离的脐衍生细胞培养物的扩增潜力。按照前一实施例中所述，分离脐衍生细胞。如上所述将细胞以 1,000 个细胞/cm² 接种并传代直到衰老。使细胞在标准大气条件下于 37°C 生长。每周两次更换生长培养基。在细胞达到约 85% 融合时，使细胞传代。在每次传代时，细胞均用胰蛋白酶消化并通过锥虫蓝染色进行计数。计算每次传代的细胞产量、群体倍增数 ($\ln(\text{最终细胞} / \text{初始细$

胞)/ln 2) 和倍增时间(培养时间/群体倍增数)。将前一传代的总产量乘以每次传代的扩增系数求出每次传代的细胞总产量(即扩增系数=最终细胞/初始细胞)。使细胞生长在明胶和无明胶包被的培养瓶中。

[0278] 研究表明,在某些情况下,低 O₂ 细胞培养条件可促进细胞扩增。(参见例如 US20040005704)。为了确定通过改变细胞培养条件是否可改进脐衍生细胞的细胞扩增。使脐衍生细胞的培养物在低氧条件下生长。将细胞以 5,000 个细胞/cm² 接种在明胶包被的培养瓶的生长培养基中。使细胞最初在标准大气条件下培养到传代 5,此时将它们转移到低氧(5% O₂) 培养条件下。

[0279] 在其它实验中,使细胞在未包被的、胶原包被的、纤连蛋白包被的、层粘连蛋白包被的和基质胶包被的板上扩增。培养物表明在这些不同的基质上扩增良好。

[0280] 脐衍生细胞扩增超过 40 次传代,在 60 天内得到的细胞产量> 1E17 个细胞。相比之下, MSC 和成纤维细胞分别在< 25 天和< 60 天后开始衰老。虽然脂肪衍生细胞和网膜细胞两者扩增达几乎 60 天,但是它们产生的细胞总产量分别为 4.5E12 和 4.24E13。因此,在所采用的实验条件下以 5,000 个细胞/cm² 接种时,脐衍生细胞的扩增比生长在相同条件下的其它细胞类型好得多(表 6-1)。

[0281] 表 6-1:生长至衰老的不同细胞群的生长特性

[0282]

细胞类型	衰老	群体倍增总数	产量(总细胞数)
MSC	24 天	8	4.72E7
脂肪衍生细胞	57 天	24	4.5E12
成纤维细胞	53 天	26	2.82E13
脐	65 天	42	6.15E17

[0283] 脐衍生细胞和成纤维细胞扩增大于 10 次传代,在 60 天内得到的细胞产量> 1E11 个细胞(表 6-2)。在这些条件下,成纤维细胞和脐衍生细胞群在 80 天后开始衰老,分别完成> 50 和> 40 个群体倍增。

[0284] 表 6-2:从传代 10 到衰老采用低密度生长扩增的不同细胞群的生长特性

[0285]

细胞类型 (传代数)	衰老	群体倍增总数	产量(总细胞数)
成纤维细胞 (P10)	80 天	43.68	2.59 E11
脐(P10)	80 天	53.6	1.25 E14

[0286] 在低氧条件下细胞扩增良好,然而,在低氧条件下培养对产后衍生细胞的细胞扩增无显著作用。所做的有关低氧作用的任何最终结论最好在从初始分离起便使细胞生长在低氧下的实验中得出,在这个意义上,上述这些结果是初步的。标准大气条件已经证实可成功用于生长足够数目的细胞,且低氧培养不是产后衍生细胞生长所必需的。

[0287] 在标准大气氧气下,使分离的脐衍生细胞以约 5,000 个细胞/cm² 的密度生长在明胶包被的或未包被的培养瓶的生长培养基中的本发明的细胞扩增条件,足以在传代 11 产生大量细胞。此外,数据表明,采用较低密度培养条件(例如 1,000 个细胞/cm²),细胞可容易地扩增。低氧条件下的脐衍生细胞扩增也有利于细胞扩增,虽然当采用这些生长条件时还未观察到细胞扩增潜力的逐渐改善。目前,在标准大气条件下培养脐衍生细胞优选用于产生大的细胞群。然而,当改变培养条件时,脐衍生细胞扩增同样被改变。这种策略可用来提高这些细胞群的增殖和分化能力。

[0288] 在所采用的条件下,虽然 MSC 和脂肪衍生细胞的扩增潜力有限,但是脐衍生细胞容易扩增到大的数目。

[0289] 实施例 7

[0290] 含有 D- 缬氨酸的培养基中的细胞生长

[0291] 据报道,可以采用含有 D- 缬氨酸而不是正常 L- 缬氨酸同种型的培养基选择性地抑制培养中成纤维细胞样细胞的生长。(Hongpaisan, J, Cell Biol Int., 2000 ;24 :1-7 ; Sordillo, L M 等, Cell Biol Int Rep., 1988 ;12 :355-64)。进行实验以确定脐衍生细胞是否可生长在含有 D- 缬氨酸的培养基中。

[0292] 将脐衍生细胞 (P5) 和成纤维细胞 (P9) 以 5,000 个细胞/cm² 接种到明胶包被的 T75 培养瓶 (Corning, Corning, NY) 中。24 小时后,弃去培养基,将细胞用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) (Gibco, Carlsbad, Ca.) 洗涤以除去残留的培养基。将培养基更换为改良生长培养基 (DMEM+D- 缬氨酸 (特殊级 Gibco)、15% (v/v) 透析胎牛血清 (Hyclone, Logan, UT)、0.001% (v/v) β 巯基乙醇 (Sigma)、50 单位/毫升的青霉素和 50 毫克/毫升的链霉素 (Gibco))。

[0293] 与接种到含有透析血清的生长培养基中的细胞不同,接种到含有 D- 缬氨酸的培养基中的脐衍生细胞和成纤维细胞无法增殖。成纤维细胞形态上发生变化,体积变大并且形状改变。4 周后,全部细胞死亡,最终从培养瓶表面脱落。因此,可以得出结论,脐带组织衍生细胞需要 L- 缬氨酸以便细胞生长和保持长期存活力。对于脐带组织衍生细胞,优选不从生长培养基中去除 L- 缬氨酸。

[0294] 实施例 8

[0295] 细胞的核型分析

[0296] 用于细胞疗法的细胞系优选是均质的 (homogeneous) 且不含任何污染的细胞类型。用于细胞疗法的人细胞应具有正常的染色体数 (46) 和正常的结构。为了鉴定是均质的且不含非脐组织来源的细胞的脐衍生细胞系,对细胞样品的核型进行了分析。

[0297] 将得自男性新生儿产后组织的 UTC 在生长培养基中培养。选择男性新生儿 (X,Y) 的产后组织以区分新生儿衍生细胞和母体衍生细胞 (X,X)。将细胞以 5,000 个细胞/平方厘米接种在 T25 培养瓶 (Corning, Corning, NY) 的生长培养基中,并扩增至 80% 融合。装有细胞的 T25 培养瓶用生长培养基装至瓶颈。通过快递将样品发送到临床细胞遗传学实验室 (估计实验室与实验室间的运送时间为 1 小时)。由人类与分子遗传学中心 (Center for Human & Molecular Genetics, New Jersey Medical School, Newark, NJ) 进行了染色体分析。在最好观察染色体的中期进行了细胞分析。在统计的 20 个中期细胞中,5 个细胞用于正常同质核型数 (2 倍体) 的分析。如果观察到 2 倍体核型,则细胞样品鉴定为同质样品。如果观察到 2 倍以上核型,则细胞样品鉴定为异质样品。当鉴定为异质核型数 (4 倍体) 时,

进一步统计和分析附加中期细胞。

[0298] 细胞遗传学实验室工作人员将送交染色体分析的所有细胞样品解释为具有正常外观。所分析的 16 个细胞系中的 3 个具有异质表型 (XX 和 XY), 这就表明了存在来源于新生儿和母体两者来源的细胞 (表 8-1)。各细胞样品均鉴定为均质样品。(表 8-1)。

[0299] 表 8-1. UTC 的核型结果。

[0300]

组织	传代	中期细胞计数	中期细胞分析数	核型数	ISCN 核型
脐	23	20	5	2	46, XX
脐	6	20	5	2	46, XY
脐	3	20	5	2	46, XX

[0301] 染色体分析鉴定了脐衍生 UTC, 其核型显得正常, 正如临床细胞遗传学实验室所解释的一样。核型分析还鉴定了不含母体细胞的细胞系, 正如均质核型所鉴定的一样。

[0302] 实施例 9

[0303] 细胞表面标记的流式细胞术评价

[0304] 可以使用通过流式细胞术表征细胞表面蛋白或“标记”以确定细胞系的特性。可从多个供体, 以及在暴露于不同的处理和培养条件下的细胞中, 测定表达的一致性。由脐分离的产后细胞系通过流式细胞术表征, 提供用于鉴定这些细胞系的特征谱。

[0305] 将细胞在血浆处理的 T75、T150 和 T225 组织培养瓶 (Corning, Corning, NY) 的生长培养基中培养直到融合。在室温下将 2% (w/v) 明胶 (Sigma, St. Louis, MO) 温育 20 分钟, 从而用明胶包被培养瓶的生长表面。

[0306] 将培养瓶中的贴壁细胞在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) (Gibco, Carlsbad, MO) 中洗涤; 用胰蛋白酶 /EDTA (Gibco) 剥离。收获细胞, 离心, 并以 1×10^7 / 毫升的细胞浓度重新悬浮于 3% (v/v) FBS/PBS 中。按照生产商的说明书, 将抗目标细胞表面标记的抗体 (见下文) 加入 100 微升细胞悬液中, 使混合物于 4°C 避光温育 30 分钟。温育后, 将细胞用 PBS 洗涤后, 离心除去未结合的抗体。将细胞重新悬浮于 500 微升 PBS 中, 通过流式细胞术进行了分析。流式细胞术分析用 FACS calibur 仪器 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 进行。

[0307] 采用下列抗细胞表面标记的抗体。

[0308] 表 9-1 :用于表征 UDC 的细胞表面标记的抗体。

[0309]

抗体	生产商	目录号
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen	555394
CD31	BD Pharmingen	555446
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45RA	BD Pharmingen	555489
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
PDGFr- α	BD Pharmingen	556002
HLA-A、B、C	BD Pharmingen	555553
HLA-DR、DP、DQ	BD Pharmingen	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG-PE	Sigma	P-4685

[0310] 在传代 8、15 和 20, 对脐衍生细胞进行了分析。

[0311] 为了比较供体间的差异, 对来自不同供体的脐带组织衍生细胞彼此进行了比较。

[0312] 还对在明胶包被的培养瓶中培养的脐衍生细胞与在未包被的培养瓶中培养的脐衍生细胞进行了比较。

[0313] 比较了用于细胞分离和制备的 4 种处理。对用下列酶处理的产后组织得到的细胞进行了比较: 1) 胶原酶; 2) 胶原酶 / 分散酶; 3) 胶原酶 / 透明质酸酶; 和 4) 胶原酶 / 透明质酸酶 / 分散酶。

[0314] 通过流式细胞术分析的传代 8、15 和 20 的脐带衍生细胞全都表达 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 和 HLA-A、B、C, 表现在与 IgG 对照相比荧光增强。这些细胞对 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 和 HLA-DR、DP、DQ 是阴性的, 表现在荧光值与 IgG 对照的一致。

[0315] 通过流式细胞术分析的自各个供体分离的脐带衍生细胞分别对 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 和 HLA-A、B、C 的产生呈阳性, 反映在与 IgG 对照相比荧光值增加。这些细胞对 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 和 HLA-DR、DP、DQ 的产生呈阴性, 其荧光值与 IgG 对照的一致。

[0316] 通过流式细胞术分析的在明胶包被的和未包被的培养瓶中扩增的脐带衍生细胞对 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 和 HLA-A、B、C 的产生全部呈阳性, 其中与 IgG 对照相比, 荧光值增加。这些细胞对 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 和 HLA-DR、DP、DQ 的产生呈阴性, 其中荧光值与 IgG 对照的一致。

[0317] 通过流式细胞术分析的脐带衍生细胞证实了这些细胞系的特征。这些脐带衍生细胞对 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 和 HLA-A、B、C 呈阳性; 而对 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 和 HLA-DR、DP、DQ 呈阴性。这种特征在变量的变化之间是一致的, 包括供体、传代、培养瓶表面涂层、消化酶和胎盘层。在各荧光值直方图曲线平均值和幅度上观察到一

些变化,但是在测试的所有条件下所有阳性曲线均是常态的,且表达荧光值大于 IgG 对照,因此证实了细胞包含具有标记阳性表达的均质群。

[0318] 实施例 10

[0319] 通过寡核苷酸阵列分析细胞

[0320] 使用寡核苷酸阵列比较具有成纤维细胞、人间充质干细胞的脐衍生细胞和胎盘衍生细胞以及另一种来自人骨髓的细胞系的基因表达谱。这项分析提供了产后衍生细胞的特征,并鉴定出这些细胞独特的分子标记。

[0321] 产后组织衍生细胞。人脐带和胎盘获自 National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA), 经患者同意,来自正常足月分娩。接收组织后,按实施例 5 中所述,用 C:D:H 混合物消化后,分离出细胞。使细胞在明胶包被的塑料组织培养瓶的生长培养基中培养。将培养物在 37°C 与 5% CO₂ 下温育。

[0322] 成纤维细胞。人真皮成纤维细胞购自 Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; 批号 9F0844) 和 ATCC CRL-1501 (CCD39SK)。将两个细胞系在具有 10% (v/v) 胎牛血清 (Hyclone) 和青霉素 / 链霉素 (Invitrogen) 的 DMEM/F12 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中培养。使细胞在标准组织处理的塑料器皿上生长。

[0323] 人间充质干细胞 (hMSC)。hMSC 购自 Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; 批号 2F1655、2F1656 和 2F1657), 按照生产商的说明书,在 MSCGM 培养基 (Cambrex) 中培养。使细胞在 37°C 与 5% CO₂ 下在标准组织培养塑料器皿上培养。

[0324] 人髂嵴骨髓细胞 (ICBM)。经患者同意,人髂嵴骨髓得自 NDRI。骨髓按照 Ho 等人概述的方法 (W003/025149) 处理。将骨髓与裂解缓冲液 (155mM NH₄Cl、10mM KHCO₃ 和 0.1mM EDTA, pH 7.2) 以 1 份骨髓: 20 份裂解缓冲液的比率混合。将细胞悬液涡旋混合,于环境温度温育 2 分钟,并以 500xg 离心 10 分钟。弃去上清液后,将细胞沉淀重新悬浮于补充了 10% (v/v) 胎牛血清和 4mM 谷氨酰胺的最小基本培养基 - α (Invitrogen) 中。将细胞再次离心,并将细胞沉淀重新悬浮于新鲜培养基中。使用锥虫蓝排斥 (Sigma, St. Louis, MO) 统计有活力的单核细胞。将单核细胞以 5×10^4 个细胞 / cm² 接种到塑料组织培养瓶中。在标准大气 O₂ 下或在 5% O₂ 下,将细胞在 37°C 与 5% CO₂ 下温育。在不更换培养基的情况下培养细胞 5 天。培养 5 天后除去培养基和未贴壁细胞。使贴壁细胞保持在培养中。

[0325] 用细胞刮板从培养瓶中取出活力生长的细胞培养物放入冷的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中。将细胞以 300xg 离心 5 分钟。弃去上清液后,将细胞重新悬浮于新鲜 PBS 中,再次离心。弃去上清液,将细胞沉淀立即冷冻,并保存于 -80°C。提取细胞 mRNA,并转录至 cDNA。然后把 cDNA 转录至 cRNA,并进行生物素标记。使生物素标记的 cRNA 与 Affymetrix GENECHIP HG-U133A 寡核苷酸阵列 (Affymetrix, Santa Clara, CA) 杂交。按照生产商的说明书进行杂交和数据收集。应用“微阵列显著性分析 (Significance Analysis of Microarrays)” (SAM) 1.21 版计算机软件 (Tusher, V. G. 等, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:5116-5121) 进行数据分析。分析软件许可证可获自斯坦福大学技术许可证发放处 (Office of Technology Licensing), 更多信息可获自万维网斯坦福大学统计学系 Professor Tibshirani 网址 (www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/)。

[0326] 在本研究中分析了 14 种不同的细胞群。细胞以及传代信息、培养基质和培养基见表 10-1。

[0327] 表 10-1. 用微阵列研究分析细胞。根据细胞标识码以及分析时的传代、细胞生长基质和生长培养基列出细胞系

	细胞群	传代	基质	培养基
	脐(022803)	2	明胶	DMEM、15% FBS、2-BME
	脐(042103)	3	明胶	DMEM、15% FBS、2-BME
	脐(071003)	4	明胶	DMEM、15% FBS、2-BME
	胎盘(042203)	12	明胶	DMEM、15% FBS、2-BME
	胎盘(042903)	4	明胶	DMEM、15% FBS、2-BME
	胎盘(071003)	3	明胶	DMEM、15% FBS、2-BME
	ICBM (070203) (5% O ₂)	3	塑料	MEM 10% FBS
[0328]	ICBM (062703) (标准 O ₂)	5	塑料	MEM 10% FBS
	ICBM (062703) (5% O ₂)	5	塑料	MEM 10% FBS
	hMSC (批号 2F1655)	3	塑料	MSCGM
	hMSC (批号 2F1656)	3	塑料	MSCGM
	hMSC (批号 2F1657)	3	塑料	MSCGM
	人成纤维细胞(9F0844)	9	塑料	DMEM-F12、10% FBS
	人成纤维细胞 (CCD39SK)	4	塑料	DMEM-F12、10% FBS

[0329] 如上所述,用 SAM 软件通过主成分分析对数据进行了评价。分析显示,在受试细胞中,290 种基因以不同的相对量表达。这项分析提供了群间的相对比较。

[0330] 表 10-2 表示计算得到的用于细胞对比较的欧几里得距离。欧几里得距离以基于在细胞类型中差异性表达的 290 种基因的细胞比较为基础。欧几里得距离与 290 种基因表达间的相似性成反比。

[0331] 表 10-2. 细胞对的欧几里得距离。使用在细胞类型间差异性表达的 290 种基因,计算出细胞类型的欧几里得距离。细胞间的相似性与欧几里得距离成反比。

	细胞对	欧几里得距离
	ICBM-HMSC	24.71
	胎盘-脐	25.52
	ICBM-成纤维细胞	36.44
	ICBM-胎盘	37.09
[0332]	成纤维细胞-MSC	39.63
	ICBM-脐	40.15
	成纤维细胞-脐	41.59
	MSC-胎盘	42.84
	MSC-脐	46.86
	ICBM-胎盘	48.41

[0333] 表 10-3、10-4 和 10-5 显示基因表达在胎盘衍生细胞中增加 (表 10-3)、在脐带衍生细胞中增加 (表 10-4), 而在脐带和胎盘衍生细胞中降低 (表 10-5)。

[0334] 表 10-3. 与测定的其它细胞系相比, 在胎盘衍生细胞中表达特异性增加的基因。

	胎盘衍生细胞中增加的基因		
	探针组编号	基因名称	NCBI 检索号
	209732_at	C 型(钙依赖性的, 糖识别结构域)凝集素, 超家族成员 2 (激活诱导的)	AF070642
	206067_s_at	维尔姆斯瘤 1	NM_024426
	207016_s_at	醛脱氢酶 1 家族, 成员 A2	AB015228
[0335]	206367_at	肾素	NM_000537
	210004_at	氧化型低密度脂蛋白(凝集素样)受体 1	AF035776
	214993_at	人, 克隆 IMAGE:4179671, mRNA, 部分 cds	AF070642
	202178_at	蛋白激酶 C, ζ	NM_002744
	209780_at	假设蛋白 DKFZp564F013	AL136883
	204135_at	在卵巢癌 1 中下调	NM_014890
	213542_at	人 mRNA; cDNA DKFZp547k1113 (来自克隆 DKFZp547k1113)	AI246730

[0336] 表 10-4. 与测定的其它细胞系相比, 在脐带衍生细胞中表达特异性增加的基因。

[0337]

脐带衍生细胞中增加的基因		
探针组编号	基因名称	NCBI 检索号
202859_x_at	白介素 8	NM_000584
211506_s_at	白介素 8	AF043337
210222_s_at	reticulon 1	BC000314
204470_at	趋化因子(C-X-C 基序)配体 1 (黑素瘤生长刺激活性)	NM_001511
206336_at	趋化因子(C-X-C 基序)配体 6 (粒细胞趋化蛋白 2)	NM_002993
207850_at	趋化因子(C-X-C 基序)配体 3	NM_002090
203485_at	reticulon 1	NM_021136
202644_s_at	肿瘤坏死因子, α 诱导蛋白 3	NM_006290

[0338] 表 10-5. 与测定的其它细胞系相比, 在脐带和胎盘细胞中表达降低的基因。

[0339]

脐衍生细胞和胎盘衍生细胞中降低的基因		
探针组编号	基因名称	NCBI 检索号
210135_s_at	矮小同源框 2	AF022654.1
205824_at	热激 27 kDa 蛋白 2	NM_001541.1
209687_at	趋化因子(C-X-C 基序)配体 12 (基质细胞衍生因子 1)	U19495.1
203666_at	趋化因子(C-X-C 基序)配体 12 (基质细胞衍生因子 1)	NM_000609.1
212670_at	弹性蛋白(主动脉瓣上狭窄、Williams-Beuren 综合征)	AA479278
213381_at	人 mRNA; cDNA DKFZp586M2022 (得自克隆 DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	间充质同源框 2 (生长终止特异性同源框)	NM_005924.1
205817_at	sine oculis 同源框同源物 1 (果蝇)	NM_005982.1
209283_at	晶体蛋白, α B	AF007162.1
212793_at	形态发生紊乱关联激活因子 2	BF513244
213488_at	DKFZP586B2420 蛋白	AL050143.1
209763_at	类似于 neuralin 1	AL049176
205200_at	四连蛋白(纤溶酶原结合蛋白)	NM_003278.1
205743_at	src 同源物 3 (SH3)和富含半胱氨酸的结构域	NM_003149.1
200921_s_at	B 细胞易位基因 1, 抗增殖	NM_001731.1
206932_at	胆固醇 25 羟化酶	NM_003956.1
204198_s_at	runt 相关转录因子 3	AA541630
219747_at	假设蛋白 FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	白介素 11 受体, α	NM_004512.1
202465_at	原胶原 C-内肽酶增强子	NM_002593.2
203706_s_at	卷曲同源物 7 (果蝇)	NM_003507.1
212736_at	假设基因 BC008967	BE299456
214587_at	胶原, VIII 型, α 1	BE877796
201645_at	生腱蛋白 C (六臂蛋白)	NM_002160.1
210239_at	iroquois 同源框蛋白 5	U90304.1
203903_s_at	膜铁转运辅助蛋白	NM_014799.1
205816_at	整联蛋白, β 8	NM_002214.1
203069_at	突触小泡糖蛋白 2	NM_014849.1
213909_at	人 cDNA FLJ12280 fis, 克隆 MAMMA1001744	AU147799
206315_at	细胞因子受体样因子 1	NM_004750.1

[0340]

204401_at	钾中/小电导钙激活通道, 超家族 N, 成员 4	NM_002250.1
216331_at	整联蛋白, α 7	AK022548.1
209663_s_at	整联蛋白, α 7	AF072132.1
213125_at	DKFZP586L151 蛋白	AW007573
202133_at	具有 PDZ 结合基序的转录辅激活物(TAZ)	AA081084
206511_s_at	Sine oculis 同源框同源物 2 (果蝇)	NM_016932.1
213435_at	KIAA1034 蛋白	AB028957.1
206115_at	早期生长应答蛋白 3	NM_004430.1
213707_s_at	末梢更少同源框 5	NM_005221.3
218181_s_at	假设蛋白 FLJ20373	NM_017792.1
209160_at	醛酮还原酶家族 1, 成员 C3 (3- α 羟类固醇脱氢酶, II 型)	AB018580.1
213905_x_at	双糖链蛋白聚酶	AA845258
201261_x_at	双糖链蛋白聚酶	BC002416.1
202132_at	具有 PDZ 结合基序的转录辅激活物(TAZ)	AA081084
214701_s_at	纤连蛋白 1	AJ276395.1
213791_at	脑啡肽原	NM_006211.1
205422_s_at	整联蛋白, β 样 1 (具有 EGF 样重复结构域)	NM_004791.1
214927_at	人 mRNA 全长插入 cDNA 克隆 EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	KIAA0367 蛋白	AB002365.1
219789_at	利尿钠肽受体 C/鸟苷酸环化酶 C (心钠肽受体 C)	AI628360
219054_at	假设蛋白 FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	人 mRNA; cDNA DKFZp564B222 (得自克隆 DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	突触小泡相关膜蛋白 5 (肌短蛋白)	NM_006634.1
201843_s_at	含 EGF 的纤连蛋白样胞外基质蛋白 1	NM_004105.2
221478_at	BCL2/腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3 样	AL132665.1
201792_at	AE 结合蛋白 1	NM_001129.2
204570_at	细胞色素 c 氧化酶亚基 VIIa 多肽 1 (肌肉)	NM_001864.1
201621_at	成神经细胞瘤, 致肿瘤性抑制 1	NM_005380.1
202718_at	胰岛素样生长因子结合蛋白 2, 36 kDa	NM_000597.1

[0341] 表 10-6、10-7 和 10-8 显示在人成纤维细胞 (表 10-6)、ICBM 细胞 (表 10-7) 和 MSC (表 10-8) 中表达增加的基因。

[0342] 表 10-6. 与所测定的其它细胞系相比在成纤维细胞中表达增加的基因。

 在成纤维细胞中增加的基因

双特异性磷酸酶 2

KIAA0527 蛋白

人 cDNA: FLJ23224 fis, 克隆 ADSU02206

动力蛋白, 胞质, 中间体多肽 1

锚蛋白 3, 神经纤维结(锚蛋白 G)

抑制素, β A (活化素 A, 活化素 AB α 多肽)

外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 4 (推定功能)

KIAA1053 蛋白

微管相关蛋白 1A

锌指蛋白 41

HSPC019 蛋白

[0343]

人 cDNA: FLJ23564 fis, 克隆 LNG10773

人 mRNA; cDNA DKFZp564A072 (得自克隆 DKFZp564A072)

LIM 蛋白(类似于大鼠蛋白激酶 C 结合 enigma)

B 细胞中的 κ 轻链多肽基因增强子抑制剂, 激酶复合物相关蛋白

假设蛋白 FLJ22004

人(克隆 CTG-A4) mRNA 序列

EST, 适度类似于细胞因子受体样因子 2; 细胞因子受体 CRL2

前体[人]

转化生长因子, β 2

假设蛋白 MGC29643

由单克隆抗体 MRC OX-2 鉴定的抗原

推定的 X 连锁视网膜病蛋白质

[0344] 表 10-7. 与所测定的其它细胞系相比, 在 ICBM 衍生细胞中表达增加的基因。

 在 ICBM 细胞中增加的基因

[0345]

•心锚重复蛋白

•MHC I 类区域 ORF

- 整联蛋白, $\alpha 10$
- 假设蛋白 FLJ22362
- UDP-N-乙酰基- α -D-半乳糖胺:多肽 N-乙酰基氨基半乳糖基转移酶 3 (GalNAc-T3)
- 干扰素诱导蛋白 44
- [0346] •SRY (性别决定区域 Y)-box 9 (躯干发育异常, 常染色体性逆转)
- 角蛋白相关蛋白 1-1
- 海马钙蛋白样 1
- jagged 1 (阿拉惹综合征(Alagille syndrome))
- 蛋白聚糖 1, 分泌颗粒

[0347] 表 10-8. 与所测定的其它细胞系相比, 在 MSC 细胞中表达增加的基因。

在 MSC 细胞中增加的基因

- 白介素 26
- 麦芽糖酶-葡糖淀粉酶(α -葡糖苷酶)
- 核受体超家族 4, A 组, 成员 2
- v-fos FBJ 鼠骨肉瘤病毒癌基因同源物
- 假设蛋白 DC42
- 核受体超家族 4, A 组, 成员 2
- FBJ 鼠骨肉瘤病毒癌基因同源物 B
- [0348] •WNT1 诱导型信号转导途径蛋白 1
- MCF.2 细胞系衍生的转化序列
- 钾通道, 超家族 K, 成员 15
- 软骨成对类同源异型蛋白 1
- 人 cDNA FLJ12232 fis, 克隆 MAMMA1001206
- 人 cDNA FLJ34668 fis, 克隆 LIVER2000775
- jun B 原癌基因
- B 细胞 CLL/淋巴瘤 6 (锌指蛋白 51)
- 锌指蛋白 36, C3H 型, 同源物(小鼠)

[0349] 进行本实施例以提供由脐带和胎盘衍生的细胞的分子特征。这项分析包括从 3 种不同脐带和 3 种不同胎盘衍生的细胞。该研究还包括 2 个不同的真皮成纤维细胞系、3 个间充质干细胞系和 3 个髂嵴骨髓细胞系。在 GENECHIP 寡核苷酸阵列上分析了由这些细胞表达的 mRNA, 所述阵列含有 22, 000 种基因的寡核苷酸探针。

[0350] 分析表明, 290 种基因的转录物以不同的量存在于这 5 种不同的细胞类型中。这些基因包括在胎盘衍生细胞中特异性增加的 10 种基因和在脐带衍生细胞中特异性增加的 7 种基因。发现在胎盘衍生和脐带组织衍生细胞中 54 种基因具有较低的特异性表达水平。

[0351] 如实施例 11 所述,选定基因的表达通过 PCR 得到证实。例如,与其它人细胞(例如本文测试的骨髓衍生细胞和成纤维细胞)相比,一般来讲是产后衍生细胞,具体来讲是脐衍生细胞,具有独特的基因表达谱。

[0352] 实施例 11

[0353] 细胞标记

[0354] 采用 Affymetrix GENECHIP,对人脐带衍生细胞的基因表达谱与由其它来源的细胞的基因表达谱进行了比较。鉴定出 6 种“签名(signature)”基因:氧化型 LDL 受体 1、白介素-8(IL-8)、肾素、reticulon、趋化因子受体配体 3(CXC 配体 3)和粒细胞趋化蛋白 2(GCP-2)。这些“签名”基因在脐衍生细胞中以较高水平表达。

[0355] 进行本实施例描述的方法以验证微阵列数据,并比较基因和蛋白质表达的数据,以及确立一系列可靠的测定法以检测脐衍生细胞独特的标志物。

[0356] 使脐衍生细胞(4 种分离细胞)和正常人真皮成纤维细胞(NHDF;新生儿和成人)在明胶包被的 T75 培养瓶的生长培养基中生长。使间充质干细胞(MSC)在间充质干细胞生长培养基 Bullet 试剂盒(MSCGM;Cambrex, Walkerville, MD)中生长。

[0357] 对于 IL-8 实验,从液氮中融化细胞,并以 5,000 个细胞/cm² 接种到明胶包被的培养瓶中,在生长培养基中生长 48 小时,然后在 10 毫升血清饥饿培养基[DMEM-低葡萄糖(Gibco, Carlsbad, CA)、青霉素(50 单位/毫升)、链霉素(50 微克/毫升)(Gibco)和 0.1% (w/v) 牛血清白蛋白(BSA;Sigma, St. Louis, MO)]再生长 8 小时。然后提取 RNA,上清液以 150x g 离心 5 分钟除去细胞碎片。将上清液于 -80℃ 冷冻备用于 ELISA 分析。

[0358] 将脐带组织衍生细胞以及由人新生儿包皮得到的人成纤维细胞培养在明胶包被的 T75 培养瓶的生长培养基中。将传代 11 的细胞在液氮中冷冻。将细胞融化,并转移到 15 毫升离心管中。以 150xg 离心 5 分钟后,弃去上清液。将细胞重新悬浮于 4 毫升培养基中并计数。将细胞以 375,000 个细胞/培养瓶在装有 15 毫升生长培养基的 75cm² 培养瓶中生长 24 小时。将培养基更换成血清饥饿培养基达 8 小时。在温育结束时收集血清饥饿培养基,以 14,000xg 离心 5 分钟,并保存于 -20℃。

[0359] 为了估算每个培养瓶中的细胞数,将 2 毫升胰蛋白酶/EDTA(Gibco, Carlsbad, CA)加入各培养瓶中。在细胞从培养瓶上脱离后,用 8 毫升生长培养基中和胰蛋白酶活性。将细胞转移到 15 毫升离心管中,以 150xg 离心 5 分钟。弃去上清液后,将 1 毫升生长培养基加入各管中使细胞重新悬浮。用血细胞计数器测定细胞数。

[0360] 采用 ELISA 测定法(R&D Systems, Minneapolis, MN),分析了由细胞分泌到血清饥饿培养基中的 IL-8 的量。所有测定法均按照生产商提供的说明书进行。

[0361] 从融合的脐带衍生细胞和成纤维细胞中,或者对于 IL-8 表达从上述处理细胞中提取 RNA。按照生产商的说明书(RNeasy Mini Kit;Qiagen, Valencia, CA),用 350 微升含有 β -巯基乙醇(Sigma, St. Louis, MO)的缓冲液 RLT 使细胞裂解。按照生产商的说明书(RNeasy Mini Kit;Qiagen, Valencia, CA)提取 RNA,并进行 DNA 酶处理(2.7 单位/样品)(Sigma St. Louis, MO)。RNA 用 50 微升 DEPC 处理水洗脱,并保存于 -80℃。同样从人脐带中提取 RNA。将组织(30 毫克)悬浮于 700 微升含有 β -巯基乙醇的缓冲液 RLT 中。对样品进行机械匀浆,并按照生产商的说明书进行 RNA 提取。RNA 用 50 微升 DEPC 处理水提取并保存于 -80℃。

[0362] 使用随机六聚体与 TaqMan 逆转录试剂 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 使 RNA 于 25℃ 反转录 10 分钟, 37℃ 60 分钟, 95℃ 10 分钟。将样品保存于 -20℃。

[0363] 采用实时和常规 PCR, 进一步研究了通过 cDNA 微阵列鉴定为只在脐带细胞受到调节的基因 (签名基因 - 包括氧化型 LDL 受体、白介素 -8、肾素和 reticulon)。

[0364] 使用以商品名称 Assays-on-Demand (Applied Biosystems) 基因表达产品销售的基因表达产品, 对 cDNA 样品进行了 PCR。按照生产商的说明书 (Applied Biosystems), 采用配有 ABI Prism 7000 SDS 软件的 7000 序列检测系统 (Applied Biosystems), 将氧化型 LDL 受体 (Hs00234028)、肾素 (Hs00166915)、reticulon (Hs00382515)、CXC 配体 3 (Hs00171061)、GCP-2 (Hs00605742)、IL-8 (Hs00174103) 和 GAPDH 与 cDNA 和 TaqMan Universal PCR 主体混合物混合。热循环条件最初为 50℃ 2 分钟和 95℃ 10 分钟, 接下来为 95℃ 15 秒钟 40 次循环和 60℃ 1 分钟。按照生产商的说明书 (来源于 Applied Biosystems 关于 ABI Prism 7700 序列检测系统的 2 号用户期刊), 对 PCR 数据进行了分析。

[0365] 采用 ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) 进行了常规 PCR 以证实实时 PCR 的结果。使用 2 微升 cDNA 溶液 (1x Taq 聚合酶 (商品名称 AMPLITAQ GOLD) 总体混合 PCR 反应缓冲液 (Applied Biosystems) 并于 94℃ 初始变性 5 分钟, 进行了 PCR。使扩增的各引物组最优化。对于 IL-8、CXC 配体 3 和 reticulon (94℃ 15 秒钟, 55℃ 15 秒钟和 72℃ 30 秒钟, 30 次循环); 对于肾素 (94℃ 15 秒钟, 53℃ 15 秒钟和 72℃ 30 秒钟, 38 次循环); 对于氧化型 LDL 受体和 GAPDH (94℃ 15 秒钟, 55℃ 15 秒钟和 72℃ 30 秒钟, 33 次循环)。用于扩增的引物见表 11-1。最终 PCR 反应中的引物浓度为 1 微摩尔, 不同的是 GAPDH 为 0.5 微摩尔。GAPDH 引物与实时 PCR 的相同, 不同之处在于未将生产商的 TaqMan 探针加入最终 PCR 反应中。将样品在 2% (w/v) 琼脂糖凝胶上进行分离, 并用溴化乙锭 (Sigma, St. Louis, MO) 染色。使用固定焦距 POLAROID 照相机 (VWR International, South Plainfield, NJ), 用 667 胶片 (Universal Twinpack, VWR International, South Plainfield, NJ) 拍摄图像。

[0366] 表 11-1: 所使用的引物。

[0367]

a.	引物名	引物
氧化型 LDL 受体	S:	5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO:1)
	A:	5'-AGAATGGAAAACCTGGAATAGG-3' (SEQ ID NO:2)
肾素	S:	5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (SEQ ID NO:3)
	A:	5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (SEQ ID NO:4)
Reticulon	S:	5'-TTAC AAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO:5)
	A:	5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO:6)
白介素-8	S:	5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO:7)
	A:	5'-CTTCAAAAACCTCTCCACAACC-3' (SEQ ID NO:8)
趋化因子(CXC)配体 3	S:	5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:9)
	A:	5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC-3' (SEQ ID NO:10)

[0368] 将脐带衍生细胞用冷的 4% (w/v) 低聚甲醛 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 于室

温固定 10 分钟。使用传代 0 (P0) (分离后直接使用) 和传代 11 (P11) 的各脐带衍生细胞 (脐带衍生细胞的 2 种分离细胞) 和成纤维细胞 (P11) 的一种分离细胞。使用抗下列表位的抗体进行了免疫细胞化学分析:波形蛋白 (1 : 500, Sigma, St. Louis, MO)、结蛋白 (1 : 150 ; Sigma- 针对兔产生的 ; 或 1 : 300 ; Chemicon, Temecula, CA- 针对小鼠产生的)、 α -平滑肌肌动蛋白 (SMA; 1 : 400 ; Sigma)、细胞角蛋白 18 (CK18; 1 : 400 ; Sigma)、冯维勒布兰德因子 (von Willebrand Factor, vWF; 1 : 200 ; Sigma) 和 CD34 (人 CD34III 类; 1 : 100 ; DAKOCytomation, Carpinteria, CA)。另外, 在传代 11 脐带衍生细胞中测试了下列标记: 抗人 GR α -PE (1 : 100 ; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、抗人 GCP-2 (1 : 100 ; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)、抗人氧化型 LDL 受体 1 (ox-LDL R1; 1 : 100 ; Santa Cruz Biotech) 和抗人 NOGA-A (1 : 100 ; Santa Cruz, Biotech)。

[0369] 培养物用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤, 并暴露于含有 PBS、4% (v/v) 山羊血清 (Chemicon, Temecula, CA) 和 0.3% (v/v) 曲通 (Triton) (曲通 X-100 ; Sigma, St. Louis, MO) 的蛋白质封闭溶液中 30 分钟以接近胞内抗原。如果目标表位位于细胞表面 (CD34、ox-LDL R1), 则在该方法的所有步骤中省去曲通 X-100 以防止表位丢失。此外, 在第一抗体是针对山羊产生的情况下 (GCP-2、ox-LDL R1、NOGA-A), 在整个过程中用 3% (v/v) 驴血清替换山羊血清。然后在室温下, 将在封闭溶液中稀释的第一抗体加入培养物中保持 1 小时。除去第一抗体溶液后, 用 PBS 洗涤培养物后, 加入含有封闭物 (block) 以及山羊抗小鼠 IgG- 德克萨斯红 (1 : 250 ; Molecular Probes, Eugene, OR) 和 / 或山羊抗兔 IgG-Alexa 488 (1 : 250 ; Molecular Probes) 或驴抗山羊 IgG-FITC (1 : 150, Santa Cruz Biotech) 的第二抗体溶液 (在室温下 1 小时)。然后洗涤培养物, 加入 10 微摩尔 DAPI (Molecular Probes) 10 分钟以观察细胞核。

[0370] 在免疫染色后, 在 Olympus 倒置落射荧光显微镜 (Olympus, Melville, NY) 上使用合适的荧光滤片观察荧光。在所有情况下, 阳性染色用对照染色之上的荧光信号表示, 其中按照上述整个方法步骤, 不同之处在于使用了第一抗体溶液 (无 1° 对照)。用数字彩色摄像机和 ImagePro 软件 (Media Cybernetics, Carlsbad, CA) 拍摄代表性图像。对于三重染色样品, 每张图像每次只使用一片发射光滤光片拍摄。然后应用 Adobe Photoshop 软件 (Adobe, San Jose, CA) 制成分层混合图。

[0371] 将培养瓶中的贴壁细胞在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) 中洗涤, 并用胰蛋白酶 / EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) 剥离。收获细胞, 离心, 并以 1×10^7 / 毫升的细胞浓度重新悬浮于 3% (v/v) FBS/PBS 中。将 100 微升等分悬液转入锥形管中。胞内抗原染色的细胞用 Perm/ 洗涤缓冲液 (BD Pharmingen, San Diego, CA) 透化。按照生产商的说明书, 将抗体加入等分悬液中, 细胞于 4℃ 避光温育 30 分钟。温育后, 将细胞用 PBS 洗涤, 离心除去过量抗体。将需要第二抗体的细胞重新悬浮于 100 微升 3% FBS 中。按照生产商的说明书加入第二抗体后, 使细胞于 4℃ 避光温育 30 分钟。温育后, 将细胞用 PBS 洗涤, 离心除去过量的第二抗体。将洗涤过的细胞重新悬浮于 0.5 毫升 PBS 中, 通过流式细胞术进行了分析。使用了下列抗体: 氧化型 LDL 受体 1 (sc-5813 ; Santa Cruz, Biotech)、GR α (555042 ; BD Pharmingen, Bedford, MA)、小鼠 IgG1 κ (P-4685 和 M-5284 ; Sigma) 和驴抗山羊 IgG (sc-3743 ; Santa Cruz, Biotech.)。采用 FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA) 进行了流式细胞术分析。

[0372] 在由人脐带衍生的细胞、成人和新生儿成纤维细胞以及间充质干细胞 (MSC) 的 cDNA 上进行选定“签名”基因的实时 PCR 结果表明,与其它细胞相比,reticulon 和氧化型 LDL 受体两者在脐衍生细胞中的表达较高。获自实时 PCR 的数据通过 $\Delta\Delta CT$ 方法进行了分析,并以对数标度表示。在产后细胞和对照之间,在 CXC 配体 3 和 GCP-2 的表达水平上未发现显著差异。通过常规 PCR 证实了实时 PCR 的结果。对 PCR 产物的测序进一步验证了这些观察结果。使用表 11-1 所列的常规 PCR CXC 配体 3 引物,在产后细胞和对照之间未发现 CXC 配体 3 的表达水平有显著差异。

[0373] 脐带组织衍生细胞中,细胞因子 IL-8 的表达在生长培养基培养的和血清饥饿的脐带组织衍生细胞两者中均提高。用常规 PCR 以及通过 PCR 产物测序,验证了所有的实时 PCR 数据。

[0374] 在无血清培养基中生长后,检查条件培养液中 IL-8 的存在。在脐细胞生长的培养基中检测到大量的 IL-8(表 11-2)。在人真皮成纤维细胞生长的培养基中未检测到 IL-8。

[0375] 表 11-2 :通过 ELISA 测定的 IL-8 蛋白质表达

[0376]	细胞类型	IL-8
	人成纤维细胞	ND
	胎盘分离细胞 1	ND
	UMBC 分离细胞 1	2058.42±144.67
	胎盘分离细胞 2	ND
	UMBC 分离细胞 2	2368.86±22.73
	胎盘分离细胞 3 (正常 O ₂)	17.27±8.63
	胎盘分离细胞(低 O ₂ , W/O BME)	264.92±9.88
	胎盘衍生细胞和脐带衍生细胞以及人皮肤成纤维细胞中进行的白介素-8 (IL-8)的 ELISA 测定结果。此处提供的数值单位为微微克/百万个细胞, n=2, sem. ND: 未检出	

[0377] 通过免疫细胞化学分析探测由人脐带衍生的细胞在传代 0 时产生的选定蛋白。紧接分离之后(传代 0),将细胞用 4%低聚甲醛固定,并暴露于以下 6 种蛋白质的抗体中:冯维勒布兰德因子、CD34、细胞角蛋白 18、结蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白和波形蛋白。脐带衍生细胞对 α -平滑肌肌动蛋白和波形蛋白呈阳性,其中染色方式在整个传代 11 期间是一致的。

[0378] 通过免疫细胞化学法研究了在脐带衍生细胞传代 11 中产生的 GRO α 、GCP-2、氧化型 LDL 受体 1 和 reticulon (NOGO-A)。脐带衍生细胞是 GCP-2 阳性的,但是通过该方法未检测到 GRO α 产生。此外,细胞是 NOGO-A 阳性的。

[0379] 已证实,通过微阵列和 PCR(实时和常规两种)测定的以下 4 种基因的基因表达水平的一致性:氧化型 LDL 受体 1、肾素、reticulon 和 IL-8。在脐带衍生细胞中这些基因的表达在 mRNA 水平受到差异性调节,其中在蛋白质水平上 IL-8 也受到差异调节。在 mRNA 水平上,未证实 GCP-2 和 CXC 配体 3 的差异性表达。虽然这个结果不支持最初从微阵列实验

获得的数据,但是这可能是由于方法的灵敏度差异所致。

[0380] 在传代 0 时探测由人脐带衍生细胞的 α -平滑肌肌动蛋白和波形蛋白的表达,对这两者呈阳性。在传代 11 期间都保持该染色方式。

[0381] 综上所述,完整的 mRNA 数据至少部分验证了从微阵列实验获得的数据。

[0382] 实施例 12

[0383] 细胞表型的免疫组织化学特征

[0384] 通过免疫组织化学对人脐带组织存在的细胞的表型进行了分析。

[0385] 收获人脐带组织,于 4℃ 在 4% (w/v) 低聚甲醛中浸泡固定过夜。采用针对下列表位的抗体进行了免疫组织化学分析(参见表 12-1):波形蛋白(1 : 500 ;Sigma, St. Louis, MO)、结蛋白(1 : 150, 针对兔产生的 ;Sigma ;或 1 : 300, 针对小鼠产生的 ;Chemicon, Temecula, CA)、 α -平滑肌肌动蛋白(SMA ;1 : 400 ;Sigma)、细胞角蛋白 18(CK18 ;1 : 400 ;Sigma)、冯维勒布兰德因子(vWF ;1 : 200 ;Sigma)和 CD34(人 CD34III 类 ;1 : 100 ;DAKO Cytomation, Carpinteria, CA)。另外,测定了下列标记:抗人 GRO α -PE(1 : 100 ;Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、抗人 GCP-2(1 : 100 ;Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)、抗人氧化型 LDL 受体 1(ox-LDL R1 ;1 : 100 ;Santa Cruz Biotech)和抗人 NOGO-A(1 : 100 ;Santa Cruz Biotech)。固定样本用解剖刀修整,并放置在含有乙醇的干冰浴上的 OCT 包埋化合物(Tissue-Tek OCT ;Sakura, Torrance, CA)内。然后使用标准恒冷箱(Leica Microsystems)将冷冻块切片(10 微米厚)后,铺在载玻片上用于染色。

[0386] 类似于以前的研究,进行了免疫组织化学分析。(例如 Messina 等, Exper. Neurol, 2003 ;184 :816-829)。组织切片用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤后,暴露于含有 PBS、4% (v/v) 山羊血清(Chemicon, Temecula, CA)和 0.3% (v/v) 曲通(曲通 X-100 ;Sigma)的蛋白质封闭溶液中达 1 小时以接近胞内抗原。在目标表位可能位于细胞表面的情况下(CD34、ox-LDL R1),在该方法的全部步骤中省略曲通,以防止表位丢失。此外,在第一抗体是针对山羊产生的情况下(GCP-2、ox-LDL R1、NOGO-A),在整个方法中使用 3% (v/v) 驴血清替换山羊血清。然后在室温下将在封闭溶液稀释的第一抗体用于切片时为 4 小时。除去第一抗体溶液,培养物用 PBS 洗涤后,使用含有封闭物以及山羊抗小鼠 IgG-德克萨斯红(1 : 250 ;Molecular Probes, Eugene, OR)和 / 或山羊抗兔 IgG-Alexa 488(1 : 250 ;Molecular Probes)或驴抗山羊 IgG-FITC(1 : 150 ;Santa Cruz Biotech)的第二抗体溶液(在室温下 1 小时)。洗涤培养物,加入 10 微摩尔 DAPI(Molecular Probes)10 分钟以观察细胞核。

[0387] 在免疫染色后,在 Olympus 倒置落射荧光显微镜(Olympus, Melville, NY)上使用合适的荧光滤片观察荧光。阳性染色用在对照染色之上的荧光信号表示。用数字彩色摄像机和 ImagePro 软件(Media Cybernetics, Carlsbad, CA)拍摄代表性图像。对于三重染色样品,每张图像每次只使用一片发射光滤光片拍摄。然后应用 Adobe Photoshop 软件(Adobe, San Jose, CA)制成分层混合图。

[0388] 表 12-1 :所采用的第一抗体的概况

	抗体	浓度	供应商
	波形蛋白	1:500	Sigma, St. Louis, MO
	结蛋白(rb)	1:150	Sigma
	结蛋白(m)	1:300	Chemicon, Temecula, CA
	α -平滑肌肌动蛋白(SMA)	1:400	Sigma
	细胞角蛋白 18 (CK18)	1:400	Sigma
[0389]	冯维勒布兰德因子(vWF)	1:200	Sigma
	CD34 III	1:100	DAKOCytomation, Carpinteria, CA
	GRO α -PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
	GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
	Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
	NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

[0390] 波形蛋白、结蛋白、SMA、CK18、vWF 和 CD34 在标记脐带内存在的分组细胞中表达（数据未显示）。具体地讲，vWF 和 CD34 的表达限于脐带内所包含的血管。CD34⁺ 细胞位于最深层（内腔侧）。在整个脐带的基质和血管中发现波形蛋白表达。SMA 限于基质及动脉和静脉的外壁，但不包含在血管本身内。只在血管中观察到 CK18 和结蛋白，结蛋白限于中层和外层。

[0391] 在脐带内均未观察到这些标记（数据未显示）。

[0392] 波形蛋白、结蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、细胞角蛋白 18、冯维勒布兰德因子和 CD34 在人脐带内的细胞中表达。根据体外特征研究显示仅波形蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白表达，数据表明当前的脐带衍生细胞的分离方法收获细胞的亚群，或者所分离的细胞改变标记表达为表达波形蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白。

[0393] 实施例 13

[0394] 营养因子的分泌

[0395] 测定了脐衍生细胞的选定营养因子的分泌。选择具有血管生成活性的因子，例如肝细胞生长因子 (HGF) (Rosen 等, Ciba Found. Symp., 1997 ;212 :215-26) ;单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) (Salcedo 等, Blood, 2000 ;96 :34-40) ;白介素 -8 (IL-8) (Li 等, J. Immunol., 2003 ;170 :3369-76) ;角质细胞生长因子 (KGF) ;碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) ;血管内皮生长因子 (VEGF) (Hughes 等, Ann. Thorac. Surg. 2004 ;77 :812-8) ;基质金属蛋白酶 1 组织抑制剂 (TIMP1) ;促血管生成素 2 (ANG2) ;血小板衍生生长因子 (PDGFbb) ;血小板生成素 (TPO) ;肝素结合表皮生长因子 (HB-EGF) ;基质衍生因子 1 α (SDF-1 α) ;神经营养 / 神经保护活性 (脑衍生神经营养因子 (BDNF) (Cheng 等, Dev. Biol., 2003 ;258 :319-33) ;白介素 -6 (IL-6) ;粒细胞趋化蛋白 -2 (GCP-2) ;转化生长因子 β 2 (TGF β 2) ;或趋化因子活性 (巨噬细胞炎性蛋白 1 α (MIP1 α) ;巨噬细胞炎性蛋白 1 β (MIP1 β) ;单核细胞化学引诱物 -1 (MCP-1) ;Rantes (活化调节、正常 T 细胞表达和分泌) ;I309 ;胸腺和活化调节趋化因子 (TARC) ;嗜酸性细胞选择性趋化因子 ;巨噬细胞衍生趋化因子 (MDC) ;和 (IL-8)。

[0396] 将得自脐带的细胞以及得自人新生儿包皮的人成纤维细胞，在明胶包被的 T75 培

养瓶的生长培养基中培养。将传代 11 的细胞低温保存,并保存于液氮中。融化后,将生长培养基加入细胞中,接着转移到 15 毫升离心管,细胞以 150xg 离心 5 分钟。将细胞沉淀重新悬浮于 4 毫升生长培养基中,并对细胞进行计数。将细胞以 5,000 个细胞 /cm² 接种在各含有 15 毫升生长培养基的 T75 培养瓶中,培养 24 小时。将培养基更换为无血清培养基 (DMEM- 低葡萄糖 (Gibco)、0.1% (w/v) 牛血清白蛋白 (Sigma)、青霉素 (50 单位 / 毫升) 和链霉素 (50 微克 / 毫升, Gibco)) 达 8 小时。在温育结束时,以 14,000xg 离心 5 分钟,收集无血清的条件培养液,并保存于 -20℃ 下。

[0397] 为了估算每个培养瓶中的细胞数,将细胞用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤,并用 2 毫升胰蛋白酶 /EDTA (Gibco) 剥离。

[0398] 加入 8 毫升生长培养基抑制胰蛋白酶活性。细胞以 150xg 离心 5 分钟。弃去上清液,将细胞重新悬浮于 1 毫升生长培养基中。细胞数用血细胞计数器估算。

[0399] 使细胞在 5% 二氧化碳和大气氧气中于 37℃ 生长。通过 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Mn.) 测定由各细胞样品产生的 MCP-1、IL-6、VEGF、SDF-1 α 、GCP-2、IL-8 和 TGF- β 2 的量。所有测定法都按照生产商的说明书进行。数值用微微克 / 毫升 / 百万个细胞表示 (n = 2, sem)。

[0400] 采用 Searchlight Proteome 阵列 (Pierce Biotechnology Inc.) 测定了趋化因子 (MIP1 α 、MIP1 β 、MCP-1、Rantes、I309、TARC、嗜酸性细胞选择性趋化因子、MDC、IL8)、BDNF 和血管生成因子 (HGF、KGF、bFGF、VEGF、TIMP1、ANG2、PDGFbb、TPO、HB-EGF)。Proteome 阵列是多路复用的夹心 ELISA,用于 2-16 种蛋白质 / 孔的定量测定。将 4-16 种不同的俘获抗体以 2x2、3x3 或 4x4 方式点样到 96 孔板的各孔中以形成阵列。在夹心 ELISA 步骤后,对整块板进行拍照,以拍摄该板各孔内每个点所产生的化学发光信号。每个点所产生的信号与起始标准或样品中的靶蛋白的量成比例。

[0401] MCP-1 和 IL-6 由脐衍生 PPDC 和真皮成纤维细胞分泌 (表 13-1)。SDF-1 α 和 GCP-2 由成纤维细胞分泌。GCP-2 和 IL-8 由脐衍生 PPDC 分泌。通过 ELISA 未从任何细胞类型中检出 TGF- β 2。

[0402] 表 13-1. ELISA 结果 : 营养因子的检测

[0403]

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1	GCP-2	IL-8	TGF- β 2
成纤维细胞	17 $\pm$ 1	61 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	ND	ND
脐 (022803)	1150 $\pm$ 74	4234 $\pm$ 289	ND	ND	160 $\pm$ 11	2058 $\pm$ 145	ND
脐 (071003)	2794 $\pm$ 84	1356 $\pm$ 43	ND	ND	2184 $\pm$ 98	2369 $\pm$ 23	ND

[0404] 注释 :ND :未检出, = /-sem

[0405] Searchlight™ Multiplexed ELISA 测定法。TIMP1、TPO、KGF、HGF、FGF、HBEGF、BDNF、MIP1 β 、MCP1、RANTES、I309、TARC、MDC 和 IL-8 由脐衍生 PPDC 分泌 (表 13-2 和 13-3)。未检出 Ang2、VEGF 或 PDGFbb。

[0406] 表 13-2. Searchlight™ Multiplexed ELISA 测定结果

[0407]

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306.3	ND	ND	230.5	5.0	ND	ND	27.9	1.3	ND
U1	57718.4	ND	ND	1240.0	5.8	559.3	148.7	ND	9.3	165.7
U3	21850.0	ND	ND	1134.5	9.0	195.6	30.8	ND	5.4	388.6

[0408] 注释:hFB(人成纤维细胞), U1(脐衍生 PPDC(022803)), U3(脐衍生 PPDC(071003))。

[0409] ND:未检出。

[0410] 表 13-3. Searchlight™ Multiplexed ELISA 测定结果

[0411]

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39.6	ND	ND	0.1	ND	ND	204.9
U1	ND	8.0	1694.2	ND	22.4	37.6	ND	18.9	51930.1
U3	ND	5.2	2018.7	41.5	11.6	21.4	ND	4.8	10515.9

[0412] 注释:hFB(人成纤维细胞), U1(脐衍生 PPDC(022803)), U3(脐衍生 PPDC(071003))。Eotaxin:嗜酸性细胞选择性趋化因子。ND:未检出。

[0413] 脐衍生细胞分泌多种营养因子。这些营养因子的一些,例如 HGF、bFGF、MCP-1 和 IL-8,在血管生成起重要作用。其它营养因子,例如 BDNF 和 IL-6,在神经再生或保护方面具有重要作用。

[0414] 实施例 14

[0415] 体外免疫学

[0416] 体外评价了脐带细胞系的免疫特征,以试图预测免疫应答,如有的话,这些细胞可能在体内移植后诱导免疫应答。通过流式细胞术测定了产后细胞系表达的 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ、CD80、CD86 和 B7-H2。这些蛋白质由抗原呈递细胞 (APC) 表达,并且是直接刺激幼稚 CD4⁺T 细胞所必须的 (Abbas & Lichtman, Cellular and Molecular Immunology, 第 5 版 (2003) Saunders, Philadelphia, 第 171 页)。还通过流式细胞术分析了细胞系的 HLA-G 表达 (Abbas & Lichtman, 同上)、CD 178 (Coumans 等, Journal of Immunological Methods, 1999 ;224 :185-196) 及 PD-L2 (Abbas & Lichtman, 同上 ;Brown 等, The Journal of Immunology, 2003 ;170 :1257-1266)。为了预测产后脐衍生细胞系体内诱导免疫应答的程度,用单向混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定了细胞系。

[0417] 使细胞在用 2% 明胶 (Sigma, St. Louis, MO) 包被的 T75 培养瓶 (Corning, Corning, NY) 的生长培养基中培养直到融合。

[0418] 将细胞用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) 洗涤,并用胰蛋白酶 / EDTA (Gibco, Carlsbad, MO) 剥离。收获细胞,离心,并以 1×10^7 / 毫升的细胞浓度重新悬浮于 3% (v/v) FBS/PBS 中。按照生产商的说明书,将抗体 (表 14-1) 加入 100 微升细胞悬液中,于 4℃ 避光温育 30 分钟。温育后,将细胞用 PBS 洗涤,离心除去未结合的抗体。将细胞

重新悬浮于 500 微升 PBS 中,采用 FACSCalibur 仪器 (Becton Dickinson, San Jose, CA), 通过流式细胞术进行了分析。

[0419] 表 14-1. 抗体

[0420]

抗体	生产商	目录号
HLA-DR、DP、DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen	557227
CD86	BD Pharmingen	555665
B7-H2	BD Pharmingen	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen	557846
小鼠 IgG2 α	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
小鼠 IgG1 κ	Sigma	P-4685

[0421] 在干冰上包装标记为细胞系“A”的传代 10 脐衍生 PPDC 的低温保存小瓶,并送往 CTBR(Senneville, Quebec) 以使用 CTBR SOP no. CAC-031 进行混合淋巴细胞反应。从多名男性和女性志愿者捐血者收集外周血液单核细胞 (PBMC)。筛选出 6 人志愿者血液供体以鉴定在与其它 5 个血液供体的混合淋巴细胞反应中具有强的增殖反应的单一同种异体供体。该供体被选为同种异体阳性对照供体。其余 5 名捐血者选为受体 (recipient)。刺激者 (供体) 同种异体 PBMC、自体 PBMC 和产后细胞系用丝裂霉素 C 处理。将自体 and 丝裂霉素 C 处理的刺激者细胞加入响应者 (受体) PBMC 中,培养 4 天。温育后,将 [3 H] 胸苷加入各样品中,培养 18 小时。在收获细胞后,提取放射性标记的 DNA,使用闪烁计数器测定 [3 H]-胸苷的掺入。使用 2 个细胞培养板,3 个受体 / 板,一式三份进行该反应。

[0422] 用受体加丝裂霉素 C 处理的同种异体供体的平均增殖除以受体的基础增殖,计算同种异体供体 (SIAD) 的刺激指数。用受体加丝裂霉素 C 处理的产后细胞系的平均增殖除以受体的基础增殖,计算产后细胞的刺激指数。

[0423] 筛选出 6 人志愿者血液供体以鉴定在与其它 5 名血液供体的混合淋巴细胞反应中具有强的增殖反应的一名同种异体供体。该供体被选为同种异体阳性对照供体。其余 5 个血液供体被选为受体。同种异体阳性对照供体和脐带衍生细胞系用丝裂霉素 C 处理,并在与 5 个各自的同种异体受体的混合淋巴细胞反应中培养。使用 2 个细胞培养板,3 个受体 / 板,一式三份进行该反应 (表 14-2)。平均刺激指数从 6.5 (第 1 板) 到 9 (第 2 板) 不等,同种异体供体阳性对照从 42.75 (第 1 板) 到 70 (第 2 板) 不等 (表 14-3)。

[0424] 表 14-2. 混合淋巴细胞反应数据 - 细胞系 A (脐带)

[0425] 增殖实验的 DPM

[0426] 板编号:第 1 板

[0427]

分析 编号	培养 系统	复份			平均值	标准差	CV
		1	2	3			
IM04-2478	受体的增殖基础值	1074	406	391	623.7	390.07	62.5
	自体刺激的对照(丝裂霉素 C 处理的自体细胞)	672	510	1402	861.3	475.19	55.2
	MLR 同种异体供体 IM04-2477 (丝裂霉素 C 处理)	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7
	具有细胞系的 MLR (丝裂霉素 C 处理的细胞 A 型)	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3
SI (供体)					70		
SI (细胞系)					8		
IM04-2479	受体的增殖基础值	530	508	527	521.7	11.93	2.3
	自体刺激的对照(丝裂霉素 C 处理的自体细胞)	701	567	1111	793.0	283.43	35.7
	MLR 同种异体供体 IM04-2477 (丝裂霉素 C 处理)	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1
	具有细胞系的 MLR (丝裂霉素 C 处理的细胞 A 型)	5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3
SI (供体)					47		
SI (细胞系)					7		
IM04-2480	受体的增殖基础值	1192	854	1330	1125.3	244.90	21.8
	自体刺激的对照(丝裂霉素 C 处理的自体细胞)	2963	993	2197	2051.0	993.08	48.4
	MLR 同种异体供体 IM04-2477 (丝裂霉素 C 处理)	25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7
	具有细胞系的 MLR (丝裂霉素 C 处理的细胞 A 型)	2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1
SI (供体)					23		
SI (细胞系)					3		
IM04-2481	受体的增殖基础值	695	451	555	567.0	122.44	21.6
	自体刺激的对照(丝裂霉素 C 处理的自体细胞)	738	1252	464	818.0	400.04	48.9
	MLR 同种异体供体 IM04-2477 (丝裂霉素 C 处理)	13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8
	具有细胞系的 MLR (丝裂霉素 C 处理的细胞 A 型)	4495	3671	4674	4280.0	534.95	12.5
SI (供体)					31		
SI (细胞系)					8		

[0428] 板编号:第 2 板

[0429]

分析 编号	培养 系统	复份			平均值	标准差	CV
		1	2	3			
IM04-2482	受体的增殖基础值	432	533	274	413.0	130.54	31.6
	自体刺激的对照(丝裂霉素 C 处理的自体细胞)	1459	633	598	896.7	487.31	54.3
	MLR 同种异体供体 IM04-2477 (丝裂霉素 C 处理)	24286	30823	31346	28818.3	3933.82	13.7
	具有细胞系的 MLR (丝裂霉素 C 处理的细胞 A 型)	2762	1502	6723	3662.3	2724.46	74.4
SI (供体)					70		
SI (细胞系)					9		
IM04-2477 (同种异体供体)	受体的增殖基础值	312	419	349	360.0	54.34	15.1
	自体刺激的对照(丝裂霉素 C 处理的自体细胞)	567	604	374	515.0	123.50	24.0
	细胞系 A 型	5101	3735	2973	3936.3	1078.19	27.4
		1924	4570	2153	2882.3	1466.04	50.9

[0430] 表 14-3. 在与 5 个个别的同种异体受体的混合淋巴细胞反应中, 脐细胞和同种异体供体的平均刺激指数。

[0431] 平均刺激指数

[0432]

	受体	脐细胞
第 1 板 (受体 1-4)	42.75	6.5
第 2 板 (受体 5)	70	9

[0433] 通过流式细胞术分析的脐带衍生细胞图显示 HLA-DR、DP、DQ、CD80、CD86 和 B7-H2 阴性表达,表现为荧光值与 IgG 对照一致,这就表明了脐带衍生细胞系没有直接刺激同种异体 PBMC (例如 CD4⁺T 细胞) 所需要的细胞表面分子。

[0434] 通过流式细胞术分析,脐细胞的 PD-L2 表达呈阳性,反映为与 IgG 对照相比荧光增强。细胞的 CD178 和 HLA-G 表达呈阴性,表现为荧光值与 IgG 对照一致。

[0435] 在用脐细胞系进行的混合淋巴细胞反应中,平均刺激指数为 6.5-9,而同种异体阳性对照的平均刺激指数为 42.75-70。通过流式细胞术测定,脐细胞系不表达可检测量的刺激蛋白 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ、CD80、CD86 和 B7-H2。脐细胞系也不表达免疫调节蛋白 HLA-G 和 CD178,但通过流式细胞术却检测出 PD-L2 的表达。同种异体供体 PBMC 含有表达 HLA-DR、DQ、CD8、CD86 和 B7-H2 的抗原呈递细胞,从而可供刺激同种异体淋巴细胞。在脐衍生细胞上缺乏直接刺激幼稚 CD4⁺T 细胞所必须的抗原呈递细胞表面分子,以及存在免疫调节蛋白 PD-L2,可能是与同种异体对照相比这些细胞在 MLR 中具有低刺激指数的原因。

[0436] 本发明不限于上文描述和列举的实施方案。在随附权利要求书的范围内能够改变和修改本发明。

[0437] 实施例 15

[0438] 端粒酶活性测定

[0439] 端粒酶的作用是合成端粒重复序列,端粒重复序列用于保护染色体的完整性并延长细胞的复制寿命 (Liu, K 等, PNAS, 1999 ;96 :5147-5152)。端粒酶由两个组分组成,即端粒酶 RNA 模板 (hTERT) 和端粒酶反转录酶 (hTERT)。端粒酶的调节取决于 hTERT 而不是 hTERT 的转录。因此 hTERT mRNA 的实时聚合酶链式反应 (PCR) 是公认的测定细胞端粒酶活性的方法。

[0440] 细胞分离

[0441] 进行了实时 PCR 实验以测定人脐带组织衍生细胞产生的端粒酶。按照实施例 5-7 和美国申请序列号 10/877,012 (' 012 申请) 中给出的实施例制备人脐带组织衍生细胞。一般而言,正常递送后获自 National Disease Research Interchange (Philadelphia, Pa.) 的脐带经洗涤除去血液和碎片,并进行机械分离。然后在培养基中将组织与包括胶原酶、分散酶和透明质酸酶在内的消化酶一起于 37℃ 温育。按照 ' 012 申请的实施例给出的方法培养人脐带组织衍生细胞。间充质干细胞和正常真皮成纤维细胞 (cc-2509 批号 9F0844) 获自 Cambrex, Walkersville, Md。多潜能人睾丸胚胎癌 (畸胎瘤) 细胞系 nTera-2 细胞 (NTERA-2 cl. D1) (参见 Plaia 等, Stem Cells, 2006 ;24 (3) :531-546) 购自 ATCC (Manassas, Va.), 并按照 ' 012 申请给出的方法培养。

[0442] 总 RNA 分离

[0443] 使用 RNeasy [®] 试剂盒 (Qiagen, Valencia, Ca.) 从细胞中提取 RNA。RNA 用 50 微升 DEPC 处理水洗脱,并保存于 -80℃。使用随机六聚体与 TaqMan [®] 逆转录试剂 (Applied

Biosystems, Foster City, Ca.) 使 RNA 于 25℃ 10 分钟,37℃ 60 分钟以及 95℃ 10 分钟进行反转录。将样品保存在 -20℃ 下。

[0444] 实时 PCR

[0445] 按照生产商的说明书 (Applied Biosystems), 使用 Applied Biosystems Assays-On-Demand™ (亦称 TaqMan®基因表达测定法), 在 cDNA 样品中进行了 PCR。该市售试剂盒广泛用于测定人细胞的端粒酶。简单来讲, 采用备有 ABI prism 7000 SDS 软件 (Applied Biosystems) 的 7000 序列检测系统, 将 hTERT (人端粒酶基因) (Hs00162669) 和人 GAPDH (内部对照) 与 cDNA 和 TaqMan®Universal PCR 主体混合物一起混合。热循环条件为最初 50℃ 2 分钟和 95℃ 10 分钟, 接着 95℃ 15 秒 40 次循环和 60℃ 1 分钟。按照生产商的说明书对 PCR 数据进行了分析。

[0446] 测定了人脐带组织衍生细胞 (ATCC 保藏号 PTA-6067)、成纤维细胞和间充质干细胞的 hTERT 和 18S RNA。如表 22-1 所示, 在人脐带组织衍生细胞未检出 hTERT 以及端粒酶。

[0447] 表 22-1

[0448]

	hTERT	18S RNA
脐细胞 (022803)	ND	+
成纤维细胞	ND	+

[0449] ND- 未检出 ;+ 检出信号

[0450] 测定了人脐带组织衍生细胞 (分离细胞 022803, ATCC 保藏号 PTA-6067) 和 nTera-2 细胞, 结果表明在 two 批 hUTC 中无端粒酶表达, 而畸胎瘤细胞系显示高水平的表达 (表 22-1)。

[0001]

CPCH1161835P

说明书序列表

<110> COLTER, DAVID C.
KIHM, ANTHONY J.
WARD, CHRISTINE K.
GOSIEWSKA, ANNA

<120> 肺部疾病和病症的治疗

<130> 026038.0230PTWO

<140> 61/139,425

<141> 2008-12-19

<150>

<151>

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 1

gagaaatcca aagagcaaat gg

22

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 2

agaatggaaa actggaatag g

21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 3

tcttcgatgc ttcggattcc

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 4

gaattctcgg aatctctgtt g

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0003]

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 5

ttacaagcag tgcagaaaac c

21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 6

agtaaacatt gaaaccacag cc

22

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 7

tctgcagctc tgtgtgaagg

20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成引物

[0004]

<400> 8	
cttcaaaaac ttctccacaa cc	22
<210> 9	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 合成引物	
<400> 9	
cccacgccac gctctcc	17
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 合成引物	
<400> 10	
tcctgtcagt tggtgctcc	19

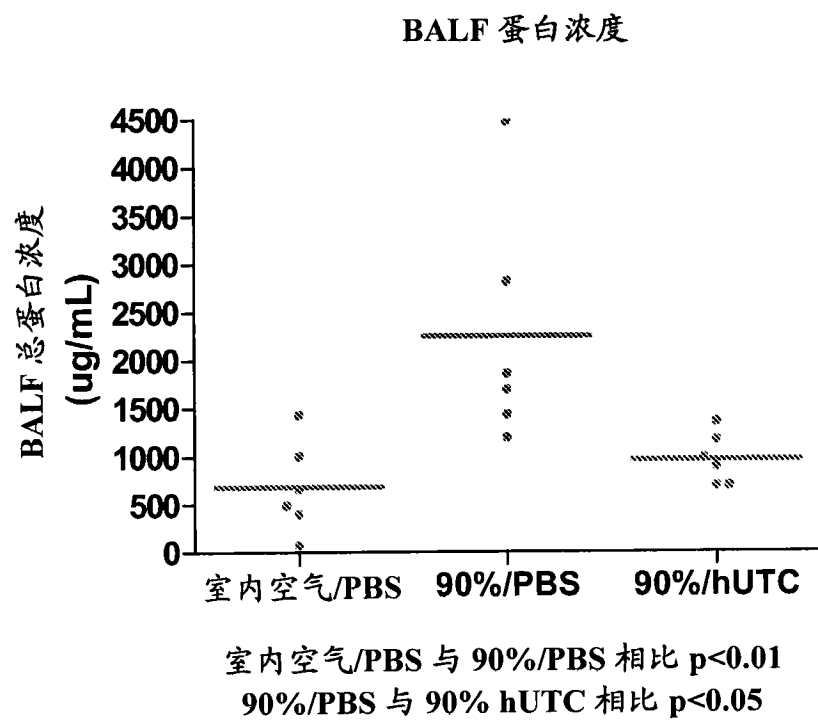


图 1

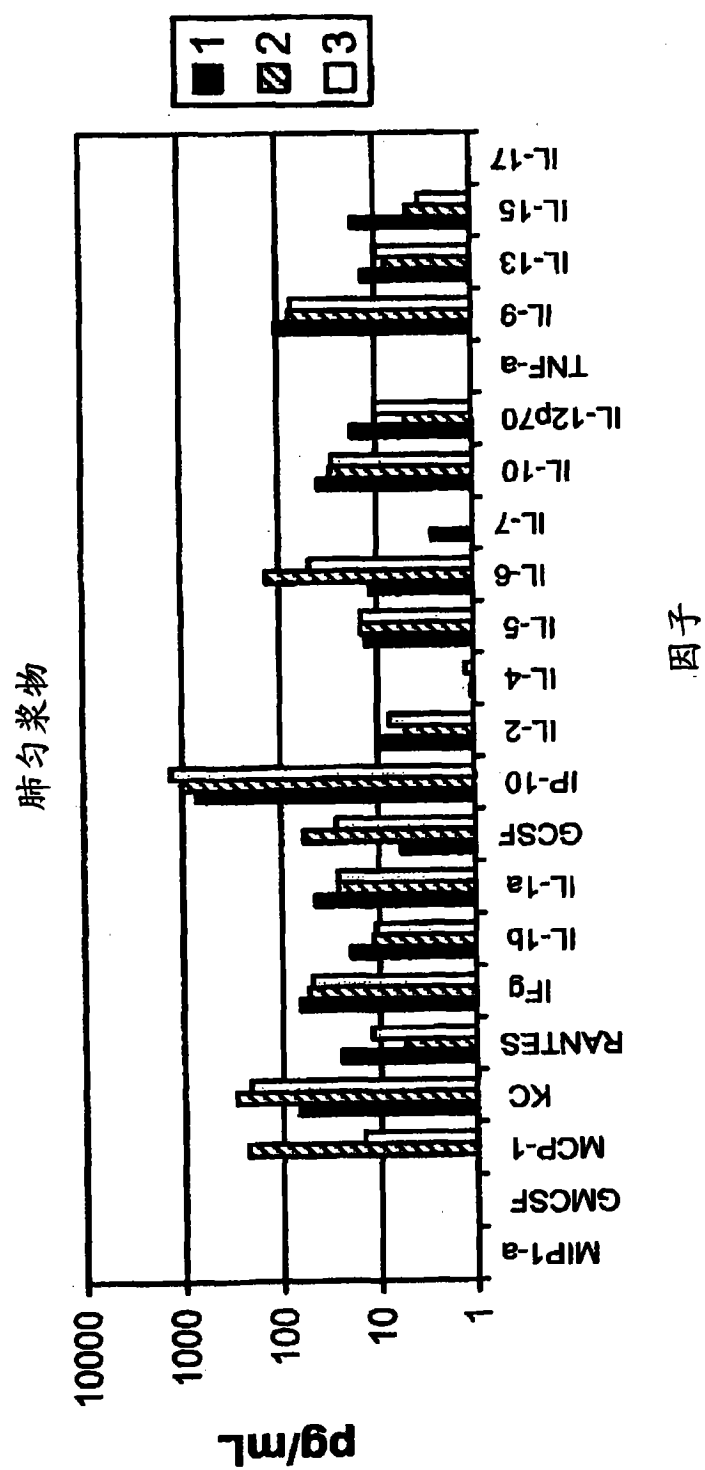


图 2a

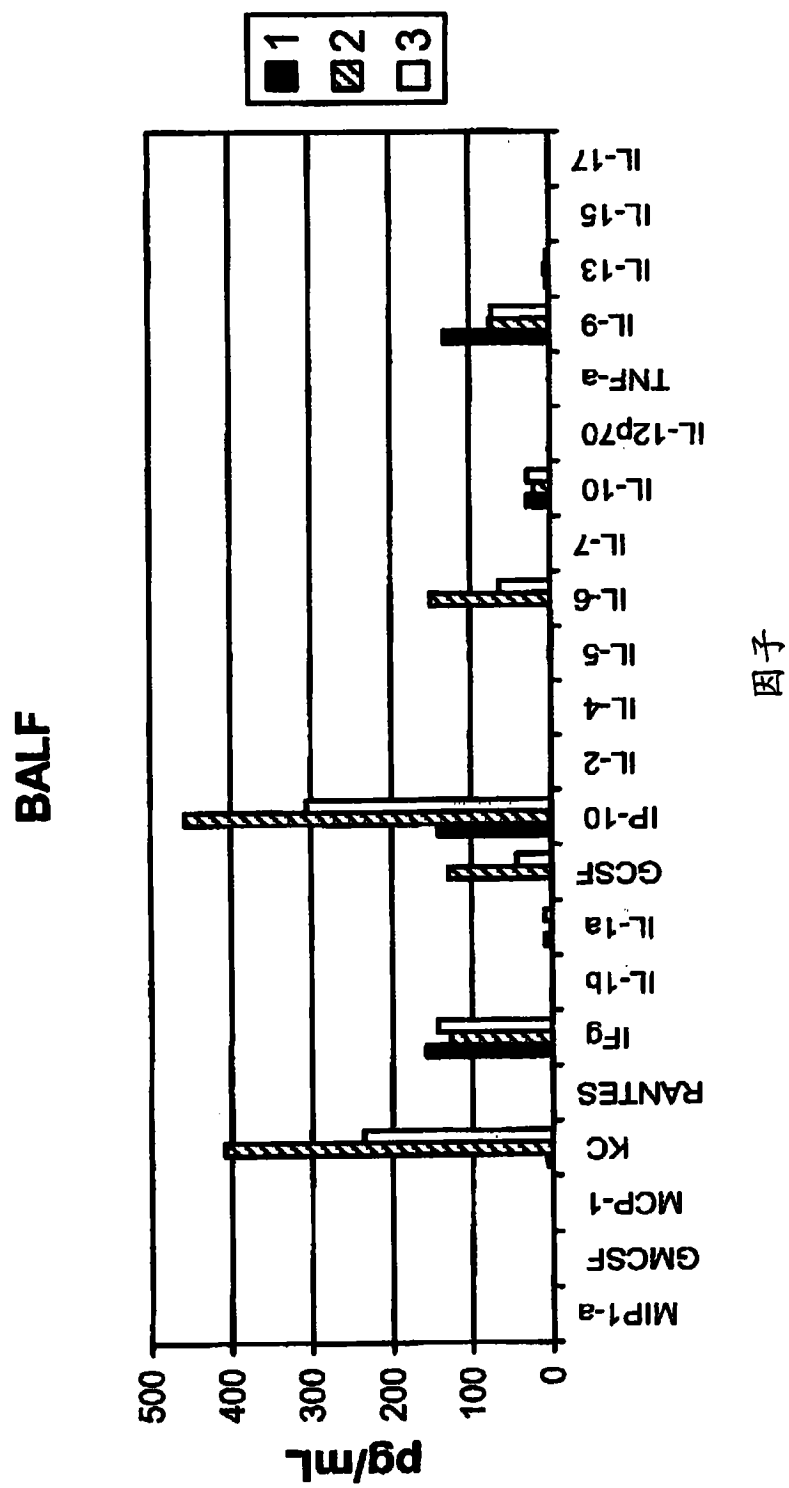


图 2b

肺匀浆物

处理组	动物 编号	MPI-a	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IFg	IL-1b	IL-1a	GCSF	IP-10	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-12p70	TNF-a	IL-9	IL-13	IL-15	IL-17
1	1	0	0	0	53	36	52	22	0	6	840	0	1	11	1	0	27	9	0	82	8	0	0
1	2	0	0	0	77	18	76	17	10	6	720	0	1	7	8	0	46	18	0	113	14	27	0
1	3	0	0	0	45	24	59	14	29	4	524	9	1	12	5	0	31	15	0	82	10	0	0
1	4	0	0	0	67	28	58	31	34	7	621	9	1	16	9	16	51	18	0	135	11	22	0
1	5	0	0	0	101	14	83	20	0	6	824	25	1	15	34	0	42	23	0	105	22	24	4
1	6	0	0	0	66	32	63	14	198	7	755	16	1	17	14	0	37	24	0	100	15	28	0
平均值:		0	0	0	68	25	65	20	45	6	714	10	1	13	12	3	39	18	0	103	13	17	1
标准差:		0	0	0	20	9	12	6	76	1	122	10	0	4	12	6	9	6	0	20	5	13	1

2	1	0	0	139	149	9	70	13	37	23	1315	8	1	30	69	0	39	12	0	96	18	0	0
2	2	0	0	526	555	4	51	4	18	171	1146	5	1	13	448	0	20	0	0	62	7	0	0
2	3	0	0	111	103	9	62	24	56	8	712	7	1	14	33	0	37	4	0	82	8	0	0
2	4	0	0	143	322	0	34	8	9	59	503	0	1	11	91	0	26	4	0	63	6	0	0
2	5	0	0	143	334	7	68	11	28	20	1783	8	1	11	47	0	30	4	0	106	8	28	0
2	6	0	0	295	303	4	39	9	11	75	619	4	1	11	121	0	27	5	0	54	0	0	0
平均值:		0	0	226	294	5	54	11	27	59	1013	5	1	15	135	0	30	5	0	77	8	5	0
标准差:		0	0	161	160	4	15	7	18	60	492	3	0	7	156	0	7	4	0	21	6	11	0

3	1	0	0	0	115	7	50	16	30	16	1121	8	1	15	31	0	34	15	0	79	15	0	0
3	2	0	0	0	163	11	50	9	38	20	1105	8	1	16	36	0	28	6	0	65	9	0	0
3	3	0	0	0	157	13	56	7	25	24	1465	7	1	16	53	0	36	9	0	68	9	0	0
3	4	0	0	0	161	16	59	8	24	12	1647	7	1	14	26	0	24	5	0	90	12	21	0
3	5	0	0	0	337	7	41	16	26	49	711	8	1	13	64	0	25	13	0	60	6	0	0
3	6	0	0	88	318	17	40	9	15	45	1839	8	2	14	84	0	24	11	0	73	6	0	0
平均值:		0	0	15	209	12	49	11	27	27	1315	8	1	15	49	0	29	10	0	72	10	3	0
标准差:		0	0	36	94	4	8	4	8	15	413	1	0	1	22	0	5	4	0	11	4	8	0
t-检验		nd	nd	0.02	0.26	0.08	0.57	0.86	1.00	0.28	0.45	0.10	0.18	0.96	0.25	nd	0.63	0.01	nd	0.68	0.31	0.86	nd

BALF															
处理组	动物 编号	MPI1-a	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IFg	IL-1b	IL-1a	GCSF	IP-10	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6
	1	0	0	0	8	0	162	0	8	0	113	0	0	0	1
	2	0	0	0	8	0	174	0	15	0	195	0	0	0	1
	3	0	0	0	7	0	131	0	0	0	95	0	0	0	0
	4	0	0	0	8	0	195	4	9	0	176	0	0	0	1
	5	0	0	0	12	0	197	0	14	0	216	0	0	0	1
	6	0	0	0	0	0	79	0	6	0	53	0	0	0	1
平均值:		0	0	0	7	0	156	1	9	0	141	0	0	0	1
标准差:		0	0	0	4	0	45	2	6	0	64	0	0	0	0
	1	0	0	0	276	0	101	0	0	59	351	0	0	4	24
	2	0	0	0	425	0	127	0	0	65	381	0	0	0	36
	3	0	0	0	390	0	183	0	7	64	435	0	1	0	27
	4	0	0	0	533	0	107	0	0	284	453	0	0	4	384
	5	0	0	0	322	0	140	0	0	70	568	0	0	0	84
	6	0	0	0	501	0	104	0	0	234	554	0	0	4	347
平均值:		0	0	0	408	0	127	0	1	129	457	0	0	2	150
标准差:		0	0	0	100	0	31	0	3	102	89	0	0	2	169
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64
标准差:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45
t-检验		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29
	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67
	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33
	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37
	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61
	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150
	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35
平均值:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64