202122577

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202122577 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：109129321　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 08 月 27 日

(51)Int. Cl.：　*C12N5/0789 (2010.01)*　*A61K35/44 (2015.01)*

A61P9/00 (2006.01)　*A61P11/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/08/28　美國　62/892,712

(71)申請人：安斯泰來再生醫藥協會 (美國) 9 TECHNOLOGY DRIVE, WESTBOROUGH 01581 MASSACHUSETTS, UNITED STATES OF AMERICA (US)
美國

(72)發明人：櫻井渚 SAKURAI, NAGISA (JP)；米洛祖　瑪麗亞 MIROTSOU, MARIA (US)；普拉森　奴丹 PRASAIN, NUTAN (US)；辛格　阿姆里塔 SINGH, AMRITA (IN)；蘭札　羅伯特 LANZA, ROBERT (US)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：75 項　圖式數：19　共 97 頁

(54)名稱

治療血管疾病之方法

(57)摘要

本發明提供用自多能幹細胞試管內獲得之造血內皮細胞（HE）治療血管疾病的方法。本發明亦提供產生該等 HE 之組成物及方法。

The present invention provides methods for treating vascular diseases with hemogenic endothelial cells (HEs) obtainedin vitrofrom pluripotent stem cells. The present invention also provides compositions and methods of producing the HEs.

指定代表圖：

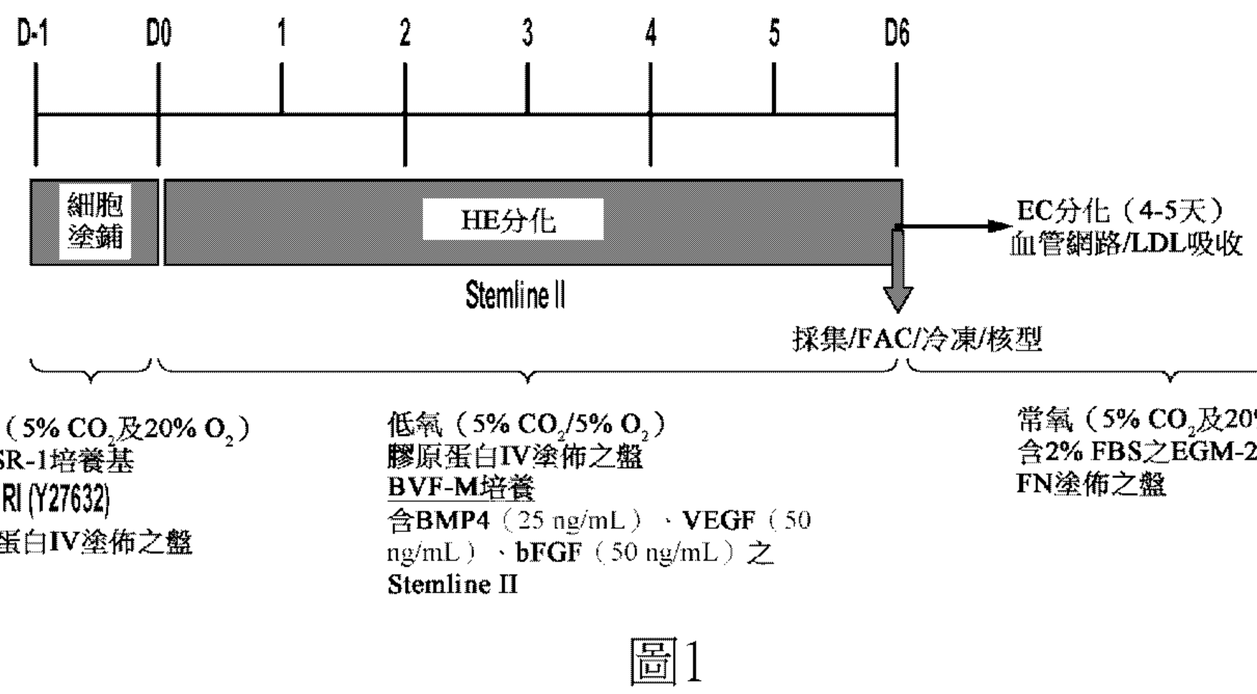


圖1

202122577

202122577

【發明摘要】

【中文發明名稱】　治療血管疾病之方法

【英文發明名稱】　METHODS OF TREATING VASCULAR DISEASES

【中文】

本發明提供用自多能幹細胞試管內獲得之造血內皮細胞（HE）治療血管疾病的方法。本發明亦提供產生該等HE之組成物及方法。

【英文】

The present invention provides methods for treating vascular diseases with hemogenic endothelial cells (HEs) obtained *in vitro* from pluripotent stem cells. The present invention also provides compositions and methods of producing the HEs.

【指定代表圖】　圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　治療血管疾病之方法

【英文發明名稱】　METHODS OF TREATING VASCULAR DISEASES

【技術領域】

【0001】　本發明係關於用藉由試管內分化多能幹細胞獲得之造血內皮細胞（hemogenic endothelial cell）治療血管疾病的方法。

相關申請案

【0002】　本申請案根據35 U.S.C. §119(e)主張2019年8月28日申請之美國臨時申請案第62/892,712號之權益，該臨時申請案以全文引用之方式併入本文中。

【先前技術】

【0003】　心血管疾病為一類涉及心臟或血管的疾病且在全世界為主要死亡原因。僅在美國，約840萬人罹患心血管疾病，且幾乎每三例死亡就有一例由心血管疾病造成。

【0004】　肺性高血壓（pulmonary hypertension，PH）為特徵在於主肺動脈中之壓力增加的病況。一種PH的致命形式為肺動脈性高血壓（pulmonary arterial hypertension，PAH），且典型地自診斷開始平均2.8年內導致死亡。PAH之特徵在於肺部血管之血管收縮及重塑。標準可用療法可改善患者之生活品質及預後，但典型地不直接預防致病重塑過程，且有時可具有嚴重副作用。

【0005】　周邊動脈疾病（peripheral arterial disease，PAD）為除大腦及冠狀動脈循環之動脈外的動脈之異常變窄及阻塞。嚴重肢體缺血（critical limb

ischemia，CLI）為一種PAD之嚴重形式，其導致下肢動脈嚴重堵塞。CLI與重大肢體缺失、心肌梗塞、中風、及死亡相關。迄今為止，CLI不存在有效的治療。

【0006】 冠狀動脈疾病為心血管疾病之最常見形式，且由因心臟動脈之動脈粥樣硬化而導致的進入心臟肌肉的血流及氧氣減少而引起。患有冠狀動脈疾病之患者通常接受通透堵塞動脈的氣球血管成形術或支架。一些人以高費用及高風險經歷冠狀動脈繞道手術。

【0007】 因此，需要更佳的治療及預防血管疾病之方法。

【發明內容】

【0008】 本發明提供治療血管疾病之方法，其包含向一個體投予包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之造血內皮細胞（hemogenic endothelial cell，HE）的組成物。

【0009】 在一實施方式中，該血管疾病選自由以下者組成之群：冠狀動脈疾病（例如動脈硬化、動脈粥樣硬化、及動脈、小動脈及微血管之其他疾病或損傷或相關不適）、心肌梗塞（例如急性心肌梗塞）、組織性心肌梗塞（organizing myocardial infarct）、缺血性心臟病、心律不整、左心室擴張、栓塞、心臟衰竭、鬱血性心臟衰竭、心內膜下纖維化、左心室肥大或右心室肥大、心肌炎、慢性冠狀動脈缺血、擴張型心肌病變、再狹窄、心律不整、心絞痛、高血壓（例如肺性高血壓、腎小球高血壓、門靜脈高血壓）、心肌肥大、包括嚴重肢體缺血之周邊動脈疾病、腦血管疾病、腎動脈狹窄、主動脈瘤、肺性心臟病、心臟性節律不整（cardiac dysrhythmias）、發炎性心臟病、先天性心臟病、風濕性心臟病、糖尿病性血管疾病、及內皮肺損傷疾病（例如急性肺損傷（ALI）及急性呼吸窘迫症候群（ARDS））。在一特定實施方式中，該血管疾病為肺性高血壓。在另一實施方式中，該血管疾病為肺動脈性高血壓。

【0010】 在本文所揭示之方法中之任一者的一實施方式中，該個體之平均肺（動脈）壓降低。

【0011】 本發明亦提供增大肺動脈中之血流的方法，其包含向一個體投予包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE的組成物。在一實施方式中，該個體患有肺性高血壓。在一特定實施方式中，該個體患有肺動脈性高血壓。

【0012】 本發明進一步提供降低個體之血壓的方法，其包含向該個體投予包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE的組成物。在一實施方式中，該個體患有肺性高血壓。在一特定實施方式中，該個體患有肺動脈性高血壓。在另一實施方式中，該血壓為舒張壓。在又另一實施方式中，該血壓為收縮壓。在另一實施方式中，該血壓為平均肺（動脈）壓。另外，該個體之血壓可藉由本發明之方法中之任一者降低至少20%。

【0013】 在一實施方式中，本文所揭示之多能幹細胞為胚胎幹細胞。在另一實施方式中，本文所揭示之多能幹細胞為誘導性多能幹細胞。

【0014】 在又另一實施方式中，本文所揭示之HE藉由在黏附條件下在不存在甲基纖維素的情況下在分化培養基中培養多能幹細胞而獲得。在另一實施方式中，本文所揭示之HE藉由在無類胚體（embryoid body）形成的情況下試管內分化多能幹細胞而獲得。

【0015】 在本文所提供之方法中之任一者中，該個體可為人類。另外，本文所揭示之多能幹細胞可為人類多能幹細胞。此外，本文所揭示之HE可為人類HE。

【0016】 本文所揭示之HE可能對於至少一種選自由以下者組成之群的微RNA（miRNA）呈陽性：miRNA-126、mi-RNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、miRNA-335、hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p。在一實施方式中，該HE對於（i）miRNA-214、miRNA-199a-

3p、及miRNA-335及/或（ii）hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。在另一實施方式中，該HE對於（i）miRNA-126、miRNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335及/或（ii）hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。在一實施方式中，該HE對於miRNA-214呈陽性。

【0017】 在實施方式之任一者中，本文所揭示之HE可能對於至少一種選自由以下者組成之群的miRNA呈陰性：miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p。在一實施方式中，該HE對於miRNA-223及miRNA-142-3p呈陰性。在另一實施方式中，該HE對於miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p呈陰性。

【0018】 在一實施方式中，該HE對於miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335呈陽性，且對於miRNA-223及miRNA-142-3p呈陰性。

【0019】 在一實施方式中，本文所揭示之HE中之任一者表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞表面標記：CD31/PECAM1、CD309/KDR、CD144、CD34、CXCR4、CD146、Tie2、CD140b、CD90、CD271、及CD105。在一實施方式中，本發明之HE表現CD146、CXCR4、CD309/KDR、CD90、及CD271。在另一實施方式中，本發明之HE表現CD146。在一實施方式中，本發明之HE表現CD31/PECAM1、CD309/KDR、CD144、CD34、及CD105。

【0020】 在一實施方式中，該HE呈現至少一種選自由CD34、CXCR7、CD43、及CD45組成之群的細胞表面標記之受限偵測或無偵測。在另一實施方式中，該HE呈現CXCR7、CD43、及CD45之受限偵測或無偵測。在另一實施方式中，該HE呈現CD43及CD45之受限偵測或無偵測。

【0021】 在一實施方式中，本發明之HE為CD43(-)、CD45(-)及/或

CD146(+)。在另一實施方式中，該HE表現CD31、鈣調理蛋白（Calponin，CNN1）、及NG2，且因此具有分化為內皮細胞（CD31+）、平滑肌細胞（鈣調理蛋白+）及/或外被細胞（NG2+）的潛能。

【0022】 在一實施方式中，表現CD144 (VECAD)之HE自本發明之HE分離。在一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現CD31及/或CD309/KDR (FLK-1)。在另一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現至少一種表22及表23中所列之基因。在另一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞標記：PLVAP、GJA4、ESAM、EGFL7、KDR/VEGFR2、及ESAM。在一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現至少一種選自由SOX9、PDGFRA、及EGFRA組成之群的細胞標記。在另一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞標記：KDR/VEGFR2、NOTCH4、膠原蛋白I、及膠原蛋白IV。在一實施方式中，包含自本發明之HE分離的表現CD144 (VECAD)之HE的組成物實質上缺乏CD144 (VECAD)陰性的HE細胞。

【0023】 因此，本發明亦提供包含本文所揭示之藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE的組成物。本發明進一步提供包含本文所揭示之藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組成物。

【圖式簡單說明】

【0024】 [圖1]為用於產生HE之例示性方法之概述。

【0025】 [圖2]為用於產生血液血管母細胞（hemangioblast，HB）之例示性方法之概述。

【0026】 [圖3]為在自ES細胞（第-1天）之分化過程之過程內的細胞之

PDGFRa、HAND1、FOXF1、APLNR、PECAM/CD31表現之條形圖。所測試時間點為第-1天（ES細胞）、第2天（D2）、第4天（D4）及第6天（D6）。

【0027】 [圖**4A**]展示在分化過程之第6天獲得之J1-HE細胞（紅色，左條）及GMP1-HE細胞（藍色，右條）中之CD31、CD43、CD34、KDR、CXCR4、CD144、CD146、及CD105表現的圖。

【0028】 [圖**4B**]展示在分化過程之第6天獲得之J1-HE細胞及GMP1-HE細胞中之CD31、VECAD、CD34、FLK1 (KDR)、CD105、CD146、CD43、CXCR4、CD140b (PDGFRb)及NG2的圖。紅色為染色對照組，灰色為未染色對照組。

【0029】 [圖**5**]展示針對CD31陽性（紅色）及陰性（藍色）細胞門控的J1-HE及GMP1-HE群體及其等之FLK1/CD309、CD144/VECAD、CD34、CD105及CD43之各別表現的圖。

【0030】 [圖**6**]展示用CD31、NG2、或CNN1抗體染色之GMP-1衍生之HE的代表性影像（下圖）。HUVEC為用於比較（上圖）。

【0031】 [圖**7**]為來自HUVEC細胞、J1 hESC、J1-HE、或J1-HB之miRNA之TSNE圖。

【0032】 [圖**8**]展示HB（VPC1）及HE（VPC2）對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之存活率的效果。

【0033】 [圖**9A**]展示藉由HUVEC、iPSC（GMP1）及GMP1-HE之不受監督的簇聚獲得的9個團簇。

【0034】 [圖**9B**]展示9個團簇中之各者中之HUVEC、iPSC（GMP1）、及GMP1-HE（「VPC餵養層活性」）之百分比。

【0035】 [圖**9C**]展示HUVEC、iPSC（GMP1）及GMP1-HE（「VPC餵養層活性」）之不同簇聚。

【0036】 [圖**10**]展示藉由VECAD/CDH5之表現鑑認之三個團簇。

【0037】 [**圖11A**]展示用媒劑（對照培養基）、西地那非（sildenafil）（陽性對照組）、J1-HE（2.5×10^{6}個細胞）、及GMP1-HE（2.5×10^{6}個細胞）治療之MCT大鼠中以及未經MCT處理之對照組（Cont(Nx)）中之右心室收縮壓（RVSP）。

【0038】 [**圖11B**]展示用媒劑（對照培養基）、西地那非（陽性對照組）、J1-HE（2.5×10^{6}個細胞）、及GMP1-HE（2.5×10^{6}個細胞）治療之MCT大鼠中以及未經MCT處理之對照組（Cont(Nx)）中之Fulton指數（RV/LV+S）。

【0039】 [**圖11C**]展示用媒劑（對照培養基）、西地那非（陽性對照組）、J1-HE（2.5×10^{6}個細胞）、及GMP1-HE（2.5×10^{6}個細胞）治療之MCT大鼠中以及未經MCT處理之對照組（Cont(Nx)）中之肺血管阻力指數（PVR指數）。

【0040】 [**圖11D**]展示用媒劑（對照培養基）、西地那非（陽性對照組）、J1-HE（2.5×10^{6}個細胞）、及GMP1-HE（2.5×10^{6}個細胞）治療之MCT大鼠中以及未經MCT處理之對照組（Cont(Nx)）中之增厚的小血管之數量。

【0041】 [**圖12A**]展示用媒劑（陰性對照組）、J1-HE（250萬個細胞）、及GMP1-HE（250萬個細胞）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的平均肺動脈壓（mPAP）。

【0042】 [**圖12B**]展示用媒劑（陰性對照組）、J1-HE（250萬個細胞）、及GMP1-HE（250萬個細胞）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的右心室收縮壓（RVSP）。

【0043】 [**圖12C**]展示用媒劑（陰性對照組）、J1-HE（250萬個細胞）、及GMP1-HE（250萬個細胞）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的Fulton指數（RV/LV+S）。

【0044】 [**圖12D**]展示用媒劑（陰性對照組）、J1-HE（250萬個細胞）、及GMP1-HE（250萬個細胞）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的心輸出量。

【0045】 [圖13A]展示用媒劑（陰性對照組）、GMP1-HE（100萬個細胞）、GMP1-HE（250萬個細胞）、GMP1-HE（500萬個細胞）、及西地那非（陽性對照組）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的平均肺動脈壓（mPAP）。

【0046】 [圖13B]展示用媒劑（陰性對照組）、GMP1-HE（100萬個細胞）、GMP1-HE（250萬個細胞）、GMP1-HE（500萬個細胞）、及西地那非（陽性對照組）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的右心室收縮壓（RVSP）。

【0047】 [圖13C]展示用媒劑（陰性對照組）、GMP1-HE（100萬個細胞）、GMP1-HE（250萬個細胞）、GMP1-HE（500萬個細胞）、及西地那非（陽性對照組）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的Fulton指數（RV/LV+S）。

【0048】 [圖13D]展示用媒劑（陰性對照組）、GMP1-HE（100萬個細胞）、GMP1-HE（250萬個細胞）、GMP1-HE（500萬個細胞）、及西地那非（陽性對照組）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的心輸出量。

【0049】 [圖14A]展示用媒劑（陰性對照組）、GMP1-HE（100萬個細胞）、GMP1-HE（250萬個細胞）、及GMP1-HE（500萬個細胞）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肺組織之組織學影像。

【0050】 [圖14B]展示用媒劑（陰性對照組）、GMP1-HE（100萬個細胞）、GMP1-HE（250萬個細胞）、GMP1-HE（500萬個細胞）、及西地那非（陽性對照組）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肺血管壁厚度。

【0051】 [圖14C]展示用媒劑（陰性對照組）、GMP1-HE（100萬個細胞）、

GMP1-HE（250萬個細胞）、GMP1-HE（500萬個細胞）、及西地那非（陽性對照組）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肌肉、半肌肉、及非肌肉肺血管之百分比。

【0052】 [**圖15A**]展示用媒劑（陰性對照組）、J1-HE（250萬個細胞）、及GMP1-HE（250萬個細胞）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肺組織之組織學影像。

【0053】 [**圖15B**]展示用媒劑（陰性對照組）、J1-HE（250萬個細胞）、及GMP1-HE（250萬個細胞）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肺血管壁厚度。

【0054】 [**圖15C**]展示用媒劑（陰性對照組）、J1-HE（250萬個細胞）、及GMP1-HE（250萬個細胞）治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肌肉、半肌肉、及非肌肉肺血管之百分比。

【0055】 [**圖16A**]展示未經Sugen處理之大鼠（Nx對照組）中之正常肺的微CT掃描影像。

【0056】 [**圖16B**]展示用媒劑治療之SuHx大鼠（陰性對照組）中之肺的微CT掃描影像。

【0057】 [**圖16C**]展示用100萬個GMP-1 HE細胞治療之SuHx大鼠中之肺的微CT掃描影像。

【0058】 [**圖16D**]展示用500萬個GMP-1 HE細胞治療之SuHx大鼠中之肺的微CT掃描影像。

【0059】 [**圖16E**]展示用西地那非治療之SuHx大鼠中之肺的微CT掃描影像。

【0060】 [**圖17**]展示針對VECAD表現分選之後在未分選HE細胞（「未分選」）中及在VECAD陰性（-部分）及VECAD陽性（+部分）細胞中CD31及VECAD

之表現。

【0061】 [圖**18A**]展示用媒劑（陰性對照組）、未分選GMP1-HE、及分選VECAD+ GMP1-HE治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的平均肺動脈壓（mPAP）。

【0062】 [圖**18B**]展示用媒劑（陰性對照組）、未分選GMP1-HE、及分選VECAD+ GMP1-HE治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的右心室收縮壓（RVSP）。

【0063】 [圖**18C**]展示用媒劑（陰性對照組）、未分選GMP1-HE、及分選VECAD+ GMP1-HE治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的Fulton指數（RV/LV+S）。

【0064】 [圖**18D**]展示用媒劑（陰性對照組）、未分選GMP1-HE、及分選VECAD+ GMP1-HE治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的心輸出量。

【0065】 [圖**18E**]展示用媒劑（陰性對照組）、未分選GMP1-HE、及分選VECAD+ GMP1-HE治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肺組織之組織學影像。

【0066】 [圖**18F**]展示用媒劑（陰性對照組）、未分選GMP1-HE、及分選VECAD+ GMP1-HE治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肺血管壁厚度。

【0067】 [圖**18G**]展示用媒劑（陰性對照組）、未分選GMP1-HE、及分選VECAD+ GMP1-HE治療的經Sugen處理之大鼠中以及未經Sugen處理之對照組（Nx）中的肌肉、半肌肉、及非肌肉肺血管之百分比。

【0068】 [圖 **19**] 展示在 J1-HE 、 GMP1-HE 、 及 HUVEC 細胞中CD31+/VECAD+群體之FLK1/KDR表現。

【實施方式】

【0069】 為使本發明可更易於理解，首先對某些術語進行定義。亦應注意不論何時敍述參數之值或值之範圍，希望值及所述值之範圍內的中間值亦為本發明之部分。

【0070】 在以下描述中，出於解釋之目的，闡述具體數量、材料及組態以便提供對本發明之透徹理解。然而，此項技術中具有通常知識者將顯而易知，本發明可在無此等特定細節之情況下實踐。在一些情況下，可省略或簡化眾所周知的特點以免模糊本發明。此外，說明書中提及諸如「一個實施方式」或「一實施方式」之片語意謂結合實施方式所描述之一特定特點、結構或特徵包括於本發明之至少一個實施方式中。諸如「在一個實施方式中」之片語在本說明書中各處之出現未必皆指同一實施方式。

【0071】 冠詞「一（a/an）」在本文中用於指代一種或指代超過一種（亦即至少一種）該冠詞之語法對象。舉例而言，「一要素」係指一個要素或超過一個要素。

【0072】 關於組成物、方法及其相應組分在本文中使用「包含（comprising/comprises）」一詞，該等組成物、方法及其相應組分對本揭示案而言為必需的，而對於未規定的要素之內容而言為開放的，無論其是否為必需的。

【0073】 如本文所用，「多能幹細胞」廣泛地指一種細胞，其能夠在試管內長時間或幾乎無限的增殖，同時保持其未分化狀態，呈現正常核型（例如染色體）且具有在適當條件下分化為所有三種胚層（亦即外胚層、中胚層及內胚層）之能力。多能幹細胞在功能上典型地定義為以下幹細胞：（a）能夠在移植於免疫缺乏（SCID）小鼠中時誘發畸胎瘤；（b）能夠分化為所有三種胚層的細胞類型（例如可分化為外胚層、中胚層及內胚層的細胞類型）；及（c）表現胚胎幹細胞

之一或多種標記（例如Oct 4、鹼性磷酸酶、SSEA-3表面抗原、SSEA-4表面抗原、nanog、TRA-1-60、TRA-1-81、SOX2、REX1等）。在某些實施方式中，多能幹細胞表現選自由以下者組成之群的一或多種標記：OCT-4、鹼性磷酸酶、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60及TRA-1-81。例示性多能幹細胞可使用例如此項技術中已知之方法生成。

【0074】 多能幹細胞包括但不限於胚胎幹細胞、誘導性多能幹（iPS）細胞、胚胎衍生之細胞（EDC）、成體幹細胞、造血細胞（hematopoietic cell）、胎兒幹細胞、間葉幹細胞、產後幹細胞或胚胎胚細胞。在一實施方式中，多能幹細胞為哺乳動物多能幹細胞。在另一實施方式中，多能幹細胞為人類多能幹細胞，包括但不限於人類胚胎幹（hES）細胞、人類誘導性多能幹（iPS）細胞、人類成體幹細胞、人類造血幹細胞、人類胎兒幹細胞、人類產後幹細胞、人類多潛能幹細胞或人類胚胎胚細胞。在一個實施方式中，多能幹細胞為人類胚胎幹細胞。在另一實施方式中，多能幹細胞為人類誘導性多能幹細胞。在另一實施方式中，多能幹細胞可為人類多能幹細胞註冊表（Human Pluripotent Stem Cell Registry；hPSCreg）中所列之多能幹細胞。多能幹細胞可經基因修飾或以其他方式經修飾以增加壽命、效能、歸巢、預防或減少異體免疫性反應或在自該等多能細胞分化之細胞中遞送所要因子。

【0075】 多能幹細胞可來自任何物種。胚胎幹細胞已成功地衍生自例如小鼠、非人類靈長類動物之多個物種及人類，且類胚胎幹細胞已自眾多額外物種生成。因此，熟習此項技術者可自任何物種生成胚胎幹細胞及胚胎衍生之幹細胞，該等物種包括但不限於人類、非人類靈長類動物、嚙齒動物（小鼠、大鼠）、有蹄動物（奶牛、綿羊等）、狗（家狗及野狗）、貓（家貓及野貓，諸如獅子、老虎、獵豹）、兔、倉鼠、沙鼠、松鼠、天竺鼠、山羊、大象、熊貓（包括大熊貓）、豬、浣熊、馬、斑馬、海洋哺乳動物（海豚、鯨等）及其類似物種。

【0076】 如本文所用，「胚胎（embryo/embryonic）」廣泛地指尚未植入母體宿主之子宮膜中之發育細胞塊。「胚胎細胞」為自胚胎分離或胚胎中所含有的細胞。此亦包括早在二細胞期獲得之分裂球及凝聚分裂球。

【0077】 如本文所用，「胚胎幹細胞」（ES細胞）廣泛地指衍生自已作為細胞系連續繼代的囊胚或桑椹胚之內細胞團的細胞。ES細胞可衍生自卵細胞與精子之受精作用、或DNA、細胞核轉移、孤雌生殖或藉助於生成HLA區域中具有純合子之ES細胞。ES細胞亦可係指衍生自藉由精子及卵細胞融合產生的受精卵、分裂球或囊胚分期之哺乳動物胚胎、細胞核轉移、孤雌生殖或重編程染色質及將重編程染色質隨後併入質膜中以產生細胞，視情況不破壞胚胎之其餘部分的細胞。胚胎幹細胞，不管其來源或用於產生其之特定方法，可基於以下特點中之一或多者經鑑別：（i）分化為所有三種胚層的細胞之能力，（ii）表現至少Oct-4及鹼性磷酸酶，及（iii）在移植至免疫功能不全動物中時產生畸胎瘤之能力。

【0078】 如本文所用，「胚胎衍生之細胞」（EDC）廣泛地指桑椹胚衍生之細胞、囊胚衍生之細胞（包括內細胞團、胚盾或上胚層之細胞）或早期胚胎（包括原內胚層、外胚層及中胚層及其衍生物）之其他多能幹細胞。「EDC」亦包括分裂球及來自凝聚的單個分裂球之細胞團或來自不同發育期之胚胎，但不包括已作為細胞系繼代之人類胚胎幹細胞。

【0079】 如本文所用，「誘導性多能幹細胞」或「iPS細胞」一般係指藉由將體細胞重編程獲得之多能幹細胞。iPS細胞可藉由表現或誘導表現各因子之組合（「重編程因子」）而生成，該等因子例如體細胞中之Oct 4（有時稱為Oct 3/4）、Sox2、Myc（例如c-Myc或任何Myc變異體）、Nanog、Lin28及Klf4。在一實施方式中，重編程因子包含Oct 4、Sox2、c-Myc及Klf4。在另一實施方式中，重編程因子包含Oct 4、Sox2、Nanog及Lin28。在某些實施方式中，至少兩個重編程因子在體細胞中表現以成功地重編程體細胞。在其他實施方式中，至少三個重編程

因子在體細胞中表現以成功地重編程體細胞。在其他實施方式中，至少四個重編程因子在體細胞中表現以成功地重編程體細胞。在另一實施方式中，至少五個重編程因子在體細胞中表現以成功地重編程體細胞。在又另一實施方式中，至少六個重編程因子在體細胞中表現，例如Oct 4、Sox2、c-Myc、Nanog、Lin28及Klf4。在其他實施方式中，鑑別額外的重編程因子且單獨或將其與一或多種已知重編程因子組合使用來將體細胞重編程為多能幹細胞。

【0080】　iPS細胞可使用胎兒、產後、新生兒、幼兒或成人的體細胞來生成。體細胞可包括但不限於纖維母細胞、角質細胞、脂肪細胞、肌肉細胞、器官及組織細胞及各種血細胞，包括但不限於造血細胞（例如造血幹細胞）。在一實施方式中，體細胞為纖維母細胞，諸如真皮纖維母細胞、滑膜纖維母細胞或肺纖維母細胞或非纖維母細胞體細胞。

【0081】　iPS細胞可獲自細胞庫。可替代地，iPS細胞可藉由此項技術中已知之方法新近生成。可使用來自特定患者或匹配供體之材料來特異性生成iPS細胞，從而生成組織匹配的細胞。在一實施方式中，iPS細胞可為實質上不具有免疫原性之通用供體細胞。

【0082】　誘導性多能幹細胞可藉由在體細胞中表現或誘導表現一或多種重編程因子而產生。可藉由使用病毒載體（諸如逆轉錄病毒載體或慢病毒載體）感染在體細胞中表現重編程因子。亦可使用CRISPR/Talen/鋅指核酸酶（XFN）。此外，可在體細胞中使用非整合載體（諸如附加型質體）或RNA表現重編程因子。當使用非整合載體表現重編程因子時，可利用載體使用體細胞之電穿孔、轉染或轉型在細胞中表現因子。舉例而言，在小鼠細胞中，使用整合病毒載體表現四種因子（Oct3/4、Sox2、c-myc及Klf4）足以重編程體細胞。在人類細胞中，使用整合病毒載體表現四種因子（Oct3/4、Sox2、NANOG及Lin28）足以重編程體細胞。

【0083】　重編程因子之表現可藉由使體細胞與至少一種試劑，諸如小的有機分子試劑接觸來誘導，該等小的有機分子試劑誘導重編程因子之表現。

【0084】　亦可使用組合方法重編程體細胞，其中（例如使用病毒載體、質體及其類似物）表現重編程因子且（例如使用小的有機分子）誘導表現重編程因子。

【0085】　一旦在細胞中表現或誘導重編程因子，可培養細胞。隨時間推移，具有ES特徵之細胞出現在培養皿中。細胞可基於例如ES細胞形態或基於可選擇或可偵測標記之表現而選擇及繼代培養。可培養細胞以產生類似ES細胞之細胞的培養物。

【0086】　為了確認iPS細胞之多能性，可在一或多次多能性分析中測試細胞。舉例而言，可針對ES細胞標記之表現測試細胞；可針對當移植至SCID小鼠中時產生畸胎瘤的能力來評估細胞；可針對分化以產生所有三種胚層的細胞類型的能力來評估細胞。

【0087】　iPS細胞可來自任何物種。此等iPS細胞已成功地使用小鼠及人類細胞生成。此外，iPS細胞已成功地使用胚胎、胎兒、新生兒及成人組織生成。因此，吾人可容易地使用來自任何物種之供體細胞生成iPS細胞。因此，吾人可自任何物種生成iPS細胞，該等物種包括但不限於人類、非人類靈長類動物、嚙齒動物（小鼠、大鼠）、有蹄動物（奶牛、綿羊等）、狗（家狗及野狗）、貓（家貓及野貓，諸如獅子、老虎、獵豹）、兔、倉鼠、山羊、大象、熊貓（包括大熊貓）、豬、浣熊、馬、斑馬、海洋哺乳動物（海豚、鯨等）及其類似物種。

【0088】　當細胞對於給定標記表徵為「陽性」或「+」時，視標記存在於細胞之細胞表面上或細胞群體內的程度而定，該細胞可為該標記之低（lo）、中間（int）及/或高（hi）表現者，其中該等術語係關於細胞之顏色分選過程中所用之螢光或其他顏色的強度。將在進行分選之特定細胞群體上使用之標記的情況

下理解lo、int及hi之區別。當細胞對於給定標記表徵為「陰性」或「-」時，其意謂，細胞或細胞群體可能不表現該標記，或標記可以相對極低含量由細胞或細胞群體表現，且其在經可偵測地標記時生成極低信號。

【0089】 在本發明之一實施方式中，若標記之表現量相對於對照組超過60%、70%、80%或90%，則細胞或細胞群體表徵為表現高（hi）含量之標記。在另一實施方式中，若標記之表現量相對於對照組介於約20%、30%、40%、50%至約60%之間，則細胞或細胞群體表徵為表現中間（int）含量之標記。在又另一實施方式中，若標記之表現量相對於對照組介於約2%、5%、10%或15%至約20%之間，則細胞或細胞群體表徵為表現低（lo）含量之標記。在另一實施方式中，若標記之表現量相對於對照組少於約2%、1.5%、1%或0.5%，則細胞或細胞群體表徵為對於標記呈陰性。在另一實施方式中，若標記之表現量相對於對照組為lo或少於約2%、1.5%、1%或0.5%，則細胞或細胞群體表徵為對於標記呈陰性。「對照組」可為適用於比較目的的一般熟習此項技術者熟悉的任何對照組或標準物，且可包括陰性對照組或陽性對照組。

【0090】 如本文所用，「治療（treatment/treating）」係指治癒（curing/healing）、緩解、減輕、改變、補救、改善（ameliorating/improving）、影響、預防或延緩疾病或病症之發作或疾病或病症之症狀。在血管修復之情況下，術語「治療（treatment/treating）」包括修復、替換、強化、改善、拯救、重建或再生血管組織。

【0091】 如本文所用，「血液血管母細胞」或「HB」係指藉由試管內分化能夠分化為至少造血細胞及內皮細胞的多能幹細胞獲得之細胞。在一實施方式中，可根據例如美國專利第9,938,500號、美國專利第9,410,123號及WO 2013/082543中所述之方法自多能幹細胞試管內生成血液血管母細胞，該等文獻中之所有者以全文引用之方式併入本文中。此外，可根據以下實施例2中所述之

方法自多能幹細胞試管內生成血液血管母細胞。在一特定實施方式中，藉由首先在以下黏附或非黏附條件下自多能幹細胞獲得類胚體，且在包含甲基纖維素之培養系統中培養類胚體，為細胞形成三維環境，從而形成胚細胞，自多能幹細胞試管內生成血液血管母細胞。在一實施方式中，可在常氧條件（例如5% CO_2及20% O_2）下自多能幹細胞產生血液血管母細胞。血液血管母細胞亦可基於其他結構及功能特性表徵，該等特性包括但不限於某些DNA、RNA、微RNA或蛋白質之表現或表現缺乏。

【0092】 在一實施方式中，血液血管母細胞對於至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種或至少五種選自由以下者組成之群的細胞表面標記呈陽性：CD31/PECAM1、CD144/VE-cadh、CD34、CD43、及CD45。在一實施方式中，HB對於CD31、CD43、及CD45呈陽性。在另一實施方式中，HBs對於CD43及CD45呈陽性。在另一實施方式中，HB表現低含量的至少一種、至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種或至少8種選自由以下者組成之群的細胞表面標記或對於其等呈陰性：CD309/KDR、CXCR4、CXCR7、CD146、Tie2、CD140b、CD90、及CD271。在另一實施方式中，HB表現低含量的CD146或對於其呈陰性。在另一實施方式中，HB表現低含量的Tie2、CD140b、CD90、及CD271或對於其等呈陰性。在又另一實施方式中，HB表現低含量的CD146、Tie2、CD140b、CD90、及CD271或對於其等呈陰性。在一實施方式中，HB對於CD43及CD45呈陽性，且表現低含量的CD146、Tie2、CD140b、CD90、及CD271或對於其等呈陰性。

【0093】 在另一實施方式中，血液血管母細胞對於至少一種、至少兩種、至少三種或至少4種選自由miRNA-126、miRNA-24、miRNA-223、及miRNA-142-3p組成之群的miRNA呈陽性。在一實施方式中，血液血管母細胞對於miRNA-126、miRNA-24、miRNA-223、及miRNA-142-3p呈陽性。在另一實施方式中，

血液血管母細胞對於至少一種、至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種或至少8種選自由以下者組成之群的miRNA呈陰性：miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、及mi-RNA-335。在一實施方式中，血液血管母細胞對於miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、及mi-RNA-335呈陰性。在另一實施方式中，血液血管母細胞對於miRNA-126、miRNA-24、miRNA-223、及miRNA-142-3p呈陽性，且對於miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、及mi-RNA-335呈陰性。

【0094】 如本文所用，「造血內皮細胞」或「HE」係指藉由試管內分化多能幹細胞獲得且具有分化為內皮細胞、平滑肌細胞、外被細胞、造血細胞及間葉細胞譜系之能力的細胞。HE可適用於治療如本文所定義之血管疾病。在一實施方式中，可根據WO 2014/100779及美國專利第9,993,503號中所述之方法自多能幹細胞試管內生成HE，該等文獻中之兩者均以全文引用之方式併入本文中。在另一實施方式中，可根據以下實施例1中所述及圖1中所示之方法自多能幹細胞試管內生成HE。

【0095】 在一特定實施方式中，可在無類胚體形成的情況下或不使用包含甲基纖維素之培養系統的情況下自多能幹細胞試管內生成HE。在一實施方式中，多能幹細胞為iPS或ES細胞。多能幹細胞可為在餵養細胞層、較佳人類餵養細胞層上，或無餵養細胞，例如在諸如Matrigel®之胞外基質上培養。多能幹細胞可在常氧條件（例如5% CO_2及20% O_2）下培養。為了分化為HE，可在缺氧條件（例如5% CO_2及5% O_2）下及在黏附條件下在分化培養基中培養多能幹細胞。黏附條件可包括在胞外基質，諸如Matrigel®、纖維接合素、明膠及膠原蛋白IV上培養細胞。分化培養基可包含基本培養基，諸如Stemline® II造血幹細胞擴增培養基

（Sigma）、伊斯科夫改進之達爾伯克培養基（Iscove's Modified Dulbecco's Medium；IMDM）、達爾伯克改進之伊格爾培養基（Dulbecco's Modified Eagle's Medium；DMEM）或任何其他已知的基本培養基。分化培養基可進一步包含用於誘導多能幹細胞分化為HE的因子，諸如骨塑型蛋白4（BMP4）、血管內皮生長因子（VEGF）及纖維母細胞生長因子（FGF）。多能幹細胞可在分化培養基中培養約1-12天、或約2-10天、或約3-8天、或約4、5、6、7或8天或直至多能幹細胞分化為HE。在一特定實施方式中，多能幹細胞在分化培養基中培養約6天或更久。

【0096】 在一實施方式中，HE可基於某些結構及功能特性表徵，該等特性包括但不限於某些DNA、RNA、微RNA或蛋白質之表現或表現缺乏。在一實施方式中，本文所揭示之HE中之任一者表現至少一種、至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種、至少8種、至少9種、至少10種或至少11種選自由以下者組成之群的細胞表面標記：CD31/PECAM1、CD309/KDR、CD144、CD34、CXCR4、CD146、Tie2、CD140b、CD90、CD271、及CD105。在一實施方式中，本發明之HE表現CD146、CXCR4、CD309/KDR、CD90、及CD271。在另一實施方式中，本發明之HE表現CD146。在另一實施方式中，HE表現CD31/PECAM1、CD309/KDR、CD144、CD34、及CD105。

【0097】 在一實施方式中，HE呈現至少一種、至少兩種、至少三種或至少四種選自由CD34、CXCR7、CD43、及CD45組成之群的細胞表面標記之受限偵測或無偵測。在另一實施方式中，HE呈現CXCR7、CD43、及CD45之受限偵測或無偵測。在另一實施方式中，HE呈現CD43及CD45之受限偵測或無偵測。

【0098】 在一實施方式中，本發明之HE為CD43(-)、CD45(-)及/或CD146(+)。在另一實施方式中，HE表現CD31、鈣調理蛋白（CNN1）及NG2，且因此具有進一步分化為內皮細胞（CD31+）、平滑肌細胞（鈣調理蛋白+）及/或外被細胞（NG2+）的潛能。

【0099】 在一實施方式中，表現CD144 (VECAD)之HE自本發明之HE分離。在一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現CD31及/或CD309/KDR (FLK-1)。在另一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現至少一種、至少兩種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種、至少8種、至少9種、至少10種、至少11種或至少12種選自表22或表23中所列之細胞標記的細胞標記。在本發明之一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞表現選自由以下者組成之群的至少1種、至少2種、至少3種、至少4種或至少5種細胞標記：PLVAP、GJA4、ESAM、EGFL7、KDR/VEGFR2、及ESAM。在一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現至少一種、至少兩種或至少三種選自由SOX9、PDGFRA、及EGFRA組成之群的細胞標記。在另一實施方式中，經分離的表現CD144 (VECAD)之HE細胞進一步表現至少一種、至少兩種、至少三種或至少四種選自由以下者組成之群的細胞標記：KDR/VEGFR2、NOTCH4、膠原蛋白I、及膠原蛋白IV。在一實施方式中，包含自本發明之HE分離的表現CD144 (VECAD)之HE的組成物實質上缺乏CD144 (VECAD)陰性的HE細胞。在一實施方式中，包含表現CD144 (VECAD)之HE的組成物包含至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%或20%的表現CD144 (VECAD)之HE。在一實施方式中，包含表現CD144 (VECAD)之HE的組成物包含少於1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%的CD144 (VECAD)陰性的HE。

【0100】 在另一實施方式中，本發明之HE對於至少一種、至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種、至少8種、至少9種或至少10種選自由以下者組成之群的微RNA（miRNA）呈陽性：miRNA-126、mi-RNA-24、

miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、miRNA-335（miRNA-335-5p及/或miRNA-335-3p）、hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p。在一實施方式中，HE對於miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335（miRNA-335-5p及/或miRNA-335-3p）呈陽性。在另一實施方式中，HE對於miRNA-126、mi-RNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335（miRNA-335-5p及/或miRNA-335-3p）呈陽性。在一實施方式中，HE對於miRNA-214呈陽性。在另一實施方式中，HE對於hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。在與美國臨時申請案第62/892,724號及其PCT申請案中所述之J1及meso 3D VPC2細胞進行比較時，hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p經鑑別為僅在HE群體中表現，該等文獻兩者以引用之方式併入本文中。

【0101】 在實施方式之任一者中，本文所揭示之HE可能對於至少一種、至少兩種、至少3種、至少4種、至少5種或至少6種選自由以下者組成之群的miRNA呈陰性：miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p。在一實施方式中，HE對於miRNA-223及miRNA-142-3p呈陰性。在另一實施方式中，HE對於miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p呈陰性。

【0102】 在一實施方式中，HE對於miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335（miRNA-335-5p及/或miRNA-335-3p）呈陽性，且對於miRNA-223及miRNA-142-3p呈陰性。

【0103】 在一實施方式中，HE經基因修飾。HE可經基因修飾以使得其表現基因產物，該等基因產物據相信或意欲促進由細胞提供之治療反應。舉例而言，HE可經基因修飾以表現及/或可為來自細胞之異源蛋白質，諸如血管內皮生長因子（VEGF）及其同功異構物、纖維母細胞生長因子（FGF，酸性及鹼性的）、

血管生成素-1及其他血管生成素、紅血球生成素、血紅素加氧酶、轉型生長因子-α（TGF-α）、轉型生長因子-β（TGF-β）或TGF-β超級家族之其他成員（包括BMP 1、2、4、7及其受體MBPR2或MBPR1）、肝生長因子（分散因子（scatter factor））、缺氧可誘導因子（HIF）、內皮細胞氧化氮合成酶、前列腺素I合成酶、Krupple樣因子（KLF-2、4及其他因子），以及適用於促進針對血管疾病之治療反應的任何其他異源蛋白質。

【0104】 如本文所用之「血管疾病」係指心臟、肺及/或血管（動脈、靜脈及微血管）之任何異常病況或損傷。血管疾病包括但不限於以下部位之疾病、病症及/或損傷：心包膜（亦即心包膜）、心臟瓣膜（例如瓣膜功能不全、瓣膜狹窄、風濕性心臟病、二尖瓣脫垂、主動脈瓣閉鎖不全）、心肌（冠狀動脈疾病、心肌梗塞、心臟衰竭、缺血性心臟病、心絞痛）、血管（例如動脈硬化、動脈瘤）或靜脈（例如靜脈曲張、痔瘡）。如本文所用之血管疾病亦包括但不限於冠狀動脈疾病（例如動脈硬化、動脈粥樣硬化、及動脈、小動脈及微血管之其他疾病或損傷或相關不適）、心肌梗塞（例如急性心肌梗塞）、組織性心肌梗塞、缺血性心臟病、心律不整、左心室擴張、栓塞、心臟衰竭、鬱血性心臟衰竭、心內膜下纖維化、左心室肥大或右心室肥大、心肌炎、慢性冠狀動脈缺血、擴張型心肌病變、再狹窄、心律不整、心絞痛、高血壓（例如肺性高血壓、腎小球高血壓、門靜脈高血壓）、心肌肥大、包括嚴重肢體缺血之周邊動脈疾病、腦血管疾病、腎動脈狹窄、主動脈瘤、肺性心臟病、心臟性節律不整、發炎性心臟病、先天性心臟病、風濕性心臟病、糖尿病性血管疾病及內皮肺損傷疾病（例如急性肺損傷（ALI）及急性呼吸窘迫症候群（ARDS））。血管疾病可由先天性缺陷、基因缺陷、環境影響（例如飲食影響、生活方式、壓力等）及其他缺陷或影響引起。

【0105】 在一實施方式中，血管疾病為肺性高血壓（PH）。肺性高血壓包括肺動脈性高血壓（PAH）、左心臟病之肺性高血壓、肺疾病及/或慢性缺氧、慢

性動脈阻塞之肺性高血壓及不明機制或多因素機制之肺性高血壓，該等不明機制或多因素機制諸如類肉瘤病、組織細胞增多症X（histocytosis X）、淋巴管瘤病及肺血管壓縮。參見Galie等人European Heart Journal 2016; 37(1):67-119。在一特定實施方式中，血管疾病為PAH。

例示性治療用途

【0106】 本發明之HE適用於治療血管疾病。因此，本發明提供一種藉由向個體投予包含本發明之HE的組成物治療個體之血管疾病的方法。在一個實施方式中，血管疾病包括但不限於以下部位之疾病、病症或損傷：心包膜（亦即心包膜）、心臟瓣膜（亦即瓣膜功能不全、瓣膜狹窄、風濕性心臟病、二尖瓣脫垂、主動脈瓣閉鎖不全）、心肌（冠狀動脈疾病、心肌梗塞、心臟衰竭、缺血性心臟病、心絞痛）、血管（亦即動脈硬化、動脈瘤）或靜脈（亦即靜脈曲張、痔瘡）。

在其他實施方式中，血管疾病包括但不限於冠狀動脈疾病（亦即動脈硬化、動脈粥樣硬化及動脈、小動脈及微血管之其他疾病或相關不適）、心肌梗塞（例如急性心肌梗塞）、組織性心肌梗塞、缺血性心臟病、心律不整、左心室擴張、栓塞、心臟衰竭、鬱血性心臟衰竭、心內膜下纖維化、左心室肥大或右心室肥大、心肌炎、慢性冠狀動脈缺血、擴張型心肌病變、再狹窄、心律不整、心絞痛、高血壓、心肌肥大、包括嚴重肢體缺血之周邊動脈疾病、腦血管疾病、腎動脈狹窄、主動脈瘤、肺性心臟病、心臟性節律不整、發炎性心臟病、先天性心臟病、風濕性心臟病、糖尿病性血管疾病及內皮肺損傷疾病（例如急性肺損傷（ALI）及急性呼吸窘迫症候群（ARDS））。

【0107】 在一實施方式中，血管疾病為肺性高血壓（PH）。在一特定實施方式中，血管疾病為PAH。

【0108】 本發明之HE亦可適用於治療血管疾病之症狀。舉例而言，HE可

用於治療以下疾病之症狀：心肌梗塞、慢性冠狀動脈缺血、動脈硬化、鬱血性心臟衰竭、擴張型心肌病變、再狹窄、冠狀動脈疾病、心臟衰竭、心律不整、心絞痛、動脈粥樣硬化、高血壓、嚴重肢體缺血、周邊血管疾病、肺性高血壓或心肌肥大。治療血管疾病之一或多種症狀可帶來臨床效益，諸如以下症狀中之一或多者減少：呼吸短促、體液滯留、頭痛、頭暈、胸痛、左肩或手臂疼痛及心室功能障礙。

【0109】 本發明之HE可呈現某些特性，其有助於使損害降低及/或降至最低，且促進損害之後的血管修復及再生。除其他之外，此等特性包括合成及分泌刺激新血管形成之生長因子的能力、合成及分泌刺激細胞存活及增殖之生長因子的能力、增殖及分化為直接參與新血管形成之細胞的能力、植入受損心肌及抑制疤痕形成（膠原蛋白沈積及交聯）的能力以及增殖及分化為血管譜系細胞的能力。在一實施方式中，本發明之HE能夠進行血管修復。在一個實施方式中，HE有助於在正常條件下的損傷後祖細胞補充。在另一實施方式中，本發明之HE能夠歸巢至血管損傷部位，且有助於再內皮化及預防新生血管內膜形成。因此，本發明之HE可用於治療因損傷或發炎或疾病而受損之血管組織。

【0110】 用本發明之HE進行之治療的效果可由（但不限於）以下臨床量度中之一者證實：心臟射出分率增加、心臟衰竭率降低、梗塞尺寸減小、相關發病率（肺水腫、腎衰竭、心律不整）降低、運動耐量或其他生活品質量度提高及死亡率降低。細胞療法之效果可能在手術之後數天至數週之時程內非常明顯。然而，有益效果可早在手術之後若干小時觀測到，且可保持若干年。

【0111】 根據本文所述之方法用本發明之HE治療之個體將通常已診斷患有、疑似患有血管疾病或處於血管疾病之風險下。血管疾病可典型地由醫師使用標準方法診斷及/或監測。「個體」及「患者」在本文中可互換使用，且係指任何脊椎動物，包括哺乳動物、嚙齒動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、綿

羊、狗、奶牛、雞、兩棲動物、爬行動物等。在一特定實施方式中，個體為靈長類動物。在另一實施方式中，個體為人類。

【0112】 在一實施方式中，本發明之方法可與現有血管療法結合實踐以有效地治療血管疾病。本發明之方法及組成物包括用非生物及/或生物藥物同時或依序進行之治療。非生物及/或生物藥物之非限制性實例包括鎮痛劑，諸如非類固醇消炎藥、鴉片促效劑及水楊酸鹽；抗感染劑，諸如驅蟲藥、抗厭氧細菌劑、抗生素、胺基醣苷抗生素、抗真菌劑抗生素、頭孢菌素抗生素、大環內酯抗生素、混雜β-內醯胺抗生素、青黴素抗生素、喹啉酮抗生素、磺醯胺抗生素、四環素抗生素、抗分枝桿菌藥、抗結核抗分枝桿菌藥、抗原蟲藥、抗瘧疾抗原蟲藥、抗病毒劑、抗逆轉錄病毒劑、殺疥蟲劑、消炎劑、皮質類固醇消炎劑、止癢劑/局部麻醉劑、局部抗感染劑、抗真菌劑局部抗感染劑、抗病毒劑局部抗感染劑；電解及腎劑，諸如酸化劑、鹼化劑、利尿劑、碳酸酐酶抑制利尿劑、環利尿劑、滲透利尿劑、留鉀利尿劑、噻哄利尿劑、電解質替代劑及排尿酸劑；酶，諸如胰臟酶及溶栓酶；胃腸道劑，諸如止瀉藥、胃腸道消炎劑、胃腸道消炎劑、抗酸劑抗潰瘍劑、胃酸泵送抑制抗潰瘍劑、胃黏膜抗潰瘍劑、H2阻斷劑抗潰瘍劑、膽石溶解劑、消化劑、催吐藥、輕瀉劑及大便軟化劑及胃腸蠕動劑；全身麻醉劑，諸如吸入麻醉劑、鹵化吸入麻醉劑、靜脈內麻醉劑、巴比妥酸鹽靜脈內麻醉劑、苯并二氮呯靜脈內麻醉劑及鴉片促效劑靜脈內麻醉劑；激素及激素改質劑，諸如墮胎藥、腎上腺劑、皮質類固醇腎上腺劑、雄激素、抗雄激素、免疫生物製劑，諸如免疫球蛋白、免疫抑制劑、類毒素及疫苗；局部麻醉劑，諸如醯胺局部麻醉劑及酯局部麻醉劑；肌肉骨胳劑，諸如抗痛風消炎劑、皮質類固醇消炎劑、金複合消炎劑、免疫抑制消炎劑、非類固醇消炎藥（NSAID）、水楊酸鹽消炎劑、礦物質；及維生素，諸如維生素A、維生素B、維生素C、維生素D、維生素E及維生素K。

投藥

【0113】 如本文所揭示，本發明之HE可藉由若干途徑投予，包括藉由靜脈或動脈輸注（包括逆行流輸注）或藉由直接注射至心臟或周邊組織中來全身性投予。特定言之藉由周邊靜脈通路之全身性投予的優勢為依賴於心臟之自然灌注的微創及血管內皮祖細胞靶向損害部位的能力。細胞可以單一推注經由緩慢輸注或經由間隔若干小時的交錯系列之應用進行注射，或所提供細胞適當地儲存若干天或若干週。細胞亦可藉由使用導管插入術應用，以使得藉由使用氣球來管理心肌血流會增強細胞首次通過心臟。如同周邊靜脈通路，細胞可經由導管以單一推注或以多個較小等分試樣注射。亦可藉由心外膜注射將細胞直接應用於心肌。此可在心內直視手術（open-heart procedure）（諸如冠狀動脈繞道移植手術）或置放心室輔助裝置之情況下在直接目測下採用。配備有針之導管可用於以心內膜方式將細胞直接遞送至心肌中，該心內膜方式將允許直接應用的更加微創的方式。

【0114】 在一個實施方式中，遞送途徑包括經由標準周邊靜脈內導管、中央靜脈導管或肺動脈導管的靜脈內遞送。在其他實施方式中，細胞可經由藉由目前可接受的方法進入的冠狀動脈內途徑遞送。細胞流動可受位於患者血管內之遠端及近端氣球的連續充氣/放氣控制，從而形成暫時無流動的區域，其促進細胞移植或細胞治療作用。在另一實施方式中，細胞可經由心內膜（心臟腔室之內表面）方法遞送，該方法可能需要使用相容性導管以及成像或偵測預期目標組織之能力。可替代地，細胞可經由心外膜（心臟之外表面）方法遞送。此遞送可在心內直視手術時經由直接目測或經由需要專用細胞遞送儀器之胸腔鏡方法達成。此外，細胞可經由以下途徑單獨或與上述經鑑別之方法中之一或多者組合遞送：皮下、肌內、氣管內、舌下、逆行冠狀動脈灌注、冠狀動脈繞道機制、體外膜式氧合（ECMO）設備及經由心包開窗術。

【0115】 在一個實施方式中，細胞以血管內推注或定時輸注方式向患者投予。

組成物

【0116】 本發明提供包含HE之組成物。在某些實施方式中，組成物包含至少1×10^3個HE。在另一實施方式中，組成物包含至少1×10^4個HE。在其他實施方式中，組成物包含至少1×10^5、至少1×10^6、至少1×10^7或至少1×10^8個HE。組成物可另外包含此項技術中已知用以增強、控制或以其他方式引導預期治療效果的添加劑。

【0117】 在一實施方式中，本發明之組成物進一步包含生物相容性基質，諸如固體載體基質、生物黏著劑或敷料或生物支架或用於3D生物列印之生物墨水。生物相容性基質可藉由支持及/或引導植入細胞之去向有助於活體內組織工程改造。生物相容性基質之非限制性實例包括可吸收及/或不可吸收的固體基質材料，諸如小腸黏膜下層（SIS），例如豬衍生的（及其他SIS源）；交聯或非交聯海藻酸酯、親水膠體、泡沫、膠原蛋白凝膠、膠原蛋白海綿、聚乙醇酸（PGA）網狀物、聚多糖（PGL）網狀物、毛絨、泡沫敷裹、生物黏著劑（例如纖維蛋白膠及纖維蛋白凝膠）、死亡的去表皮皮膚等效物、水凝膠、白蛋白、多醣、聚乳酸（PLA）、聚乙醇酸（PGA）、聚乳酸-乙醇酸（PLGA）、聚原酸酯、聚酸酐、聚膦氮烯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、乙烯乙酸乙烯酯、聚乙烯醇及其類似物。

【0118】 本發明之HE可經調配為包含HE及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組成物。醫藥學上可接受之載劑為此項技術中所熟知的，且包括生理鹽水、緩衝水溶液、溶劑、分散介質或其任何組合。醫藥學上可接受之載劑之非限制性實例包括糖，諸如乳糖、葡萄糖及蔗糖；澱粉，諸如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；纖維

素及其衍生物，諸如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及乙酸纖維素；粉末狀黃蓍；麥芽；明膠；滑石；賦形劑，諸如可可脂及栓劑蠟；油，諸如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油及大豆油；乙二醇，諸如丙二醇；多元醇，諸如丙三醇、山梨糖醇、甘露糖醇及聚乙二醇；酯，諸如油酸乙酯及月桂酸乙酯；瓊脂；緩衝劑，諸如氫氧化鎂及氫氧化鋁；海藻酸；無熱原質水；等滲生理鹽水；林格氏溶液（Ringer's solution）；乙醇；pH緩衝溶液；聚酯、聚碳酸酯及/或聚酸酐；及醫藥調配物中所採用的其他無毒相容性物質。在一實施方式中，醫藥學上可接受之載劑在製造及儲存之條件下穩定。在一實施方式中，本發明之HE在WO 2017/031312中所述之GS2培養基中經調配，該文獻以全文引用之方式併入本文中。

【0119】 本發明進一步提供包含HE之冷凍保存之組成物。冷凍保存之組成物可進一步包含冷凍保存劑。冷凍保存劑為此項技術中已知的，且包括但不限於二甲亞碸（DMSO）、丙三醇等。冷凍保存之組成物亦可包含等滲溶液，諸如細胞培養基。

【0120】 藉由以下實施例進一步說明本發明，該等實施例並不意欲以任何方式限制。整個本申請案中所列舉之所有參考文獻、專利及公開專利申請案之全部內容以及圖式在此以引用之方式併入本文中。

實施例

實施例1：造血內皮細胞（HE）之生成

【0121】 如圖1中所示，造血內皮細胞自人類胚胎幹細胞（hESC）或人類誘導性多能幹細胞（iPSC）生成。hESC（例如J1 hESC）或iPSC（例如GMP-1 iPSC）在mTeSR1（Stemcell Technology）加上1%青黴素/鏈黴素中在人類真皮纖維母細胞餵養細胞上在6孔盤中培養四天，且每天更換培養基。為塗鋪hESC或iPSC以用

於分化（第-1天），mTeSR1培養基自6孔盤之各孔移除。各孔用抽吸的2 mL DMEM/F12（Gibco）或D-PBS、DMEM/F12或D-PBS洗滌，且將1 mL無酶Gibco®細胞解離緩衝液（CDB）添加至各孔中。該盤在常氧CO_2培育箱（5% CO_2/20% O_2）內部培育約5-8分鐘直至細胞顯示脫離的形態。隨後藉由吸取謹慎地移除CDB，而不干擾鬆散連接的細胞。細胞藉由將2 mL mTeSR1添加至各孔中收集，且收集在收集管中。孔中殘留的細胞用額外的2 mL mTeSR1輕輕洗滌，且轉移至收集管中。管以120 × g離心3分鐘，且移除培養基。細胞以400,000個細胞/10毫升之最終密度再懸浮於含有最終濃度為10 μM之Y-27632（Stemgent）之mTeSR1培養基中。將10 mL細胞懸浮液轉移至經膠原蛋白IV塗佈之10 cm盤中。將盤置放於常氧培育箱中隔夜。

【0122】 第二天（第0天），自各10 cm盤輕輕地移除mTeSR1/Y-27632培養基且替換為10 mL BVF-M培養基[Stemline® II造血幹細胞擴增培養基（Sigma）；25 ng/mL BMP4（Humanzyme）；50 ng/mL VEGF165（Humanzyme）；50 ng/mL FGF2（Humanzyme）]。盤在缺氧腔室（5% CO_2/5% O_2）中培育2天。

【0123】 在第2天，抽吸培養基且將新鮮的10-12 mL BVF-M添加至各10 cm盤。

【0124】 在第4天，再次抽吸培養基且將新鮮的10-15 mL BVF-M添加至各10 cm盤。

【0125】 在第6天，採集細胞用於移植及/或用於進一步測試。自各盤抽吸培養基且藉由添加10 mL D-PBS（Gibco）且抽吸D-PBS來洗滌盤。將5 mL StemPro Accutase（Gibco）添加至各10 cm盤中且在常氧CO_2培育箱（5% CO_2/20% O_2）中培育3-5分鐘。用5 mL吸管吸取細胞5次，隨後用P1000吸管吸取約5次。隨後經由30 μM細胞過濾器濾濾細胞且將其轉移至收集管中。10 cm盤中之各者用10 mL EGM2培養基（Lonza）或Stemline® II造血幹細胞擴增培養基（Sigma）再次沖洗，

且細胞通過30 μM細胞過濾器，且收集在收集管中。管以120-250 g離心5分鐘。細胞隨後用EGM2培養基或Stemline® II造血幹細胞擴增培養基（Sigma）再懸浮，且計數。在計數之後，使細胞快速離心（250 × g持續5分鐘）且以3×10^{6}個細胞/毫升之濃度用冷凍培養基（10% DMSO +熱滅活FBS）再懸浮。為形成冷凍儲備液，將細胞懸浮液等分於2 mL FBS（Hyclone）及DMSO（Sigma）/冷凍小瓶（6×10^{6}個細胞/2毫升/小瓶）。

實施例2：血液血管母細胞（HB）之生成

【0126】 如圖2中所示，血液血管母細胞自人類胚胎幹細胞（例如J1 hESC）或人類誘導性多能幹細胞（例如GMP-1 iPSC）生成。mTeSR1（Stemcell Technology）加上1%青黴素/鏈黴素在人類真皮纖維母細胞餵養細胞上在6孔盤中培養之hESC或iPSC藉由在37℃下（5% CO_2/20% O_2）在培育箱中與含有4 mg/mL膠原蛋白酶IV（Gibco）之DMEM/F12（Gibco）一起培育各孔約10分鐘直至細胞自盤脫離而自該等孔剝離。含有膠原蛋白酶IV之DMEM/F12自各孔移除，用DMEM/F12洗滌，且將2 mL mTeSR1添加至各孔中且必要時使用細胞刮具以使細胞自該等孔脫離　將細胞懸浮液轉移至錐形管中，且各孔用2 mL mTeSR1再次洗滌，且轉移至錐形管中。使管在300 × g下離心2分鐘且移除上清液。細胞集結粒再懸浮於BV-M培養基[Stemline® II造血幹細胞擴增培養基（Sigma）；25 ng/mL BMP4（Humanzyme）；50 ng/mL VEGF165（Humanzyme）]中且以每孔約750,000-1,200,000個細胞之密度塗鋪至超低附接表面6孔盤（Corning）上。在常氧CO_2培育箱中將盤置放於培育箱中48小時以允許類胚體形成（第0-2天）。隨後收集各孔中之培養基及細胞且以120-300 g離心3分鐘。移除一半上清液且替換為2 mL含有50 ng/mL bFGF之BV-M。因此，細胞懸浮液中之bFGF之最終濃度為約25 mg/mL，將4 mL細胞懸浮液塗鋪至超低附接表面6孔盤之各孔上且再置放於常氧CO_2培育

箱中48小時（第2-4天）以允許持續類胚體形成。

【0127】 在第4天，將類胚體收集至15 mL管中，以120-300 × g離心2分鐘，用D-PBS洗滌，且使用StemPro Accutase（Gibco）解聚為單細胞懸浮液。將FBS（Hyclone）用於使Accutase失活且使單細胞通過細胞過濾器、離心且以約1×10^6個細胞/毫升再懸浮於Stemline II培養基（Sigma）中。將約3×10^6個細胞在30 mL Methocult BGM培養基[MethoCult™ SF H4536（無EPO）（StemCell Technologies）；青黴素/鏈黴素（Gibco）；ExCyte細胞生長補充劑（1:100）（Millipore）；50 ng/mL Flt3配位體（PeproTech）；50 ngm/ml VEGF（Humanzyme）；50 ng/mL TPO（PeproTech）；30 ng/mL bFGF（Humanzyme）]中混合，再塗鋪於超低附接表面10 cm培養皿（Corning）上，且在常氧CO_2培育箱中培育7天（第4-11天）以允許形成血液血管母細胞。

【0128】 在第11天，採集血液血管母細胞用於移植及/或用於進一步測試。藉由用D-PBS（Gibco）稀釋甲基纖維素來收集血液血管母細胞。以300 × g離心細胞混合物15分鐘兩次，且再懸浮於30 mL EGM2 BulletKit培養基（Lonza）或StemlineII中且如上文所述對細胞進行計數及冷凍。

實施例3：細胞標記分析

【0129】 藉由FACS分析針對內皮細胞標記、血液/造血標記及外被細胞標記分析在第6日根據實施例1採集之HE及在第11天根據實施例2採集之血液血管母細胞（HB）。簡言之，所採集細胞以10萬/管之密度再懸浮於50 μL FACS緩衝液（2% FBS/PBS）中。根據表1添加流動式細胞測量術抗體，且在4℃下培育20分鐘。隨後將1 mL FACS緩衝液添加至各管中且以250 × g離心5分鐘。細胞再懸浮於每管不含碘化丙錠（PI）之200 μL FACS緩衝液中。在MACS定量分析儀10（Miltenyi Biotec：130-096-343）上分析樣本。HUVEC用於陽性對照組，且HDF

或未分化hESC用作陰性對照組。另外，HUVEC用作用於補償之單一染色（SS）對照組。

表1.用於MACS定量分析儀10之抗體染色表

	FITC/ AF488	**PE**	**APC**	**APC-Vio770**	**Vio Blue**
染色 **1**	CD43（1:50）	CD34（1:50）	FLK1（1:50）	CXCR4（1:50）	CD31（1:100）
染色 **2**	CD146（1:50）	cKit（1:50）	CD144（1:50）	Tie2（1:50）	CD31（1:100）
染色 **3**	CD105（1:50）	CD31（1:100）	CD271（1:100）	CD44（1:50）	CD274（1:50）
染色 **4**	CD90（1:50）	NG2（1:25）	CD140b（1:50）	VCAM1（1:50）	CD31（1:100）
SS-1	CD31（1:100）				
SS-2		CD31（1:100）			
SS-3			CD31（1:100）		
SS-4				CD31（1:100）	
SS-5					CD31（1:100）
未染色					

【0130】 可替代地，FAC分析使用SONY SA3800光譜分析儀進行。簡言之，所採集細胞以10萬-20萬/管之密度再懸浮於100 μL FACS緩衝液（2% FBS/PBS）中。根據表2添加流動式細胞測量術抗體，且在4℃下培育20分鐘。隨後將1 mL FACS緩衝液添加至各管中且以300 × g離心5分鐘。細胞再懸浮於每管含或不含PI（用FACS緩衝液進行1:1000稀釋）之100 μL FACS緩衝液中。在SONY SA3800光譜分析儀上分析樣本。HUVEC細胞用於陽性對照組，且未分化hESC用作陰性對照組。

表2.用於SONY SA3800光譜分析儀之抗體染色表

管編號		FITC	PE	APC	PI
1	未染色	-	-	-	-
2	僅 PI	-	-	-	+

3	CD31 FITC	+	-	-	-
4	CD31 PE	-	+	-	-
5	CD31 APC	-	-	+	-
6	染色 1	CD34	CD31	CD144	+
7	染色 2	CD43	CD45	CD184	+
8	染色 3	CD146	NG2	PDGFRb	+
9	染色 4	CD146	CXCR7	CD309	+

結果

【0131】 如表3-4中所示，HB對於兩種血液標記CD43及CD45及內皮細胞標記CD31、CD144及CD34呈陽性，但表現低含量或不可偵測含量之Tie2、CD140b、CD90、及CD271。

【0132】 相比之下，如表3-4中所示，HE對於CD146、CXCR4及Flk1（CD309/KDR）以及外被細胞/間葉細胞標記CD90及CD271呈陽性，但對於血液/造血標記CD43及CD45呈陰性。

表3.衍生自J1及GMP1系且在MACS定量分析儀10及/或SONY SA3800光譜分析儀）上分析之HB及HE上的細胞表面標記之概述.

	標記	**HE**	**HB**
內皮細胞標記	**CD31/PECAM1**	20-50% **（n=12）**	75-99% **（n=17）**
	CD309/KDR	10-50% **（n=9）**	1-15% **（n=10）**
	CD144/VE-cadh	5-40% **（n=12）**	15-60% **（n=17）**
	CD34	5-20% **（n=12）**	10-50% **（n=17）**
趨化介素受體	**CXCR4/CD184**	20-60% **（n=12）**	10-20% **（n=17）**
趨化介素受體	**CXCR7**	4-10% **（n=9）**	低於 5% **（n=10）**
血液標記	**CD43**	低於 10% **（n=12）**	70-95% **（n=17）**
血液標記	**CD45**	低於 5% **（n=9）**	50-90% **（n=10）**
外被細胞標記	**CD146**	50-95% **（n=9）**	5-20% **（n=10）**

表4.在MACS定量分析儀10上分析之J1衍生之HB及HE上的細胞表面標記之概

述.

	J1-HE（n=3）		J1-HB（n=7）	
	頻率（%）	SD （%）	頻率（%）	SD（%）
Tie2	35.0	0.76	0.9	0.50
CD140b	27.7	9.42	0.3	0.14
CD90	37.5	9.09	0.7	0.21
CD271	30.2	12.62	0.1	0

【0133】 分化過程期間各種細胞中之細胞標記表現之時程顯示細胞上調中胚層譜系之標記，其中PDGFRA及APLNR之表面表現在第2天達至峰值。隨後，彼等標記之表現下降，此與第6天血管細胞之標記CD31之增加相關（圖3）。利用光學顯微術之檢查表明，分化方法生成細胞混合物，其中細胞顯示內皮細胞或間葉細胞形態。

【0134】 在第6天產生之HE細胞之進一步表徵顯示，大部分細胞為表現VECAD+（CD144+）或CD140B+（PDGFRB+）但無造血標記CD43及CD45之CD146+，指示方案產生不同血管及血管周細胞。在第6天產生之HE細胞之額外表徵針對CD31、CD43、CD34、KDR (FLK1)、CXCR4、CD144、CD146、CD105、CD140b (PDGFRb)及NG2進行，且示於圖4A及4B中。

【0135】 藉由CD31表現鑑別之假定的血管內皮細胞部分對於FLK1/CD309 [亦稱為VEGFR2]、VECAD、CD34、及CD105呈陽性（圖5）。當第6天的HE細胞轉移至在常氧條件下支持血管內皮細胞再生長5-7天的培養基時，CD31、CD34、及FLK1/CD309（VEGFR2）表現維持或增加。

實施例4：HE表現內皮細胞標記、平滑肌細胞標記及外被細胞標記

【0136】 使用免疫細胞化學（ICC）之額外分析如下文所述使用HUVEC作為對照組進行。將HE塗鋪至少24小時，且隨後用含Ca2+及Mg2+（Gibco）之D-PBS洗滌兩次。隨後在室溫下將細胞用4% PFA（Electron Microscopy Science）固

定10分鐘。固定之後，細胞用含Ca2+及Mg2+之D-PBS洗滌5分鐘三次。細胞隨後用含有5%正常山羊血清（Cell Signaling Technology）之1×滲透/洗滌緩衝液（BD）處理一小時。抽吸滲透/洗滌/阻斷緩衝液之後，細胞用含有滲透/洗滌/阻斷緩衝液（人類CD31，1:50，Invitrogen；人類NG2，1:50，PD Pharmagen；人類鈣調理蛋白，1:100，Millipore）之初級抗體處理隔夜。第二天，細胞用滲透/洗滌緩衝液洗滌5分鐘三次。在室溫下將細胞隨後用含有滲透/洗滌/阻斷緩衝液（DAPI，1:1000，Invitrogen，山羊-抗Ms-Cy3，山羊-抗Rb-Alexaflour488）之二級及DAPI處理1小時。細胞用滲透/洗滌緩衝液洗滌5分鐘三次，且用Keyence BZ-X710（Keyence）捕獲影像。如圖6中所示，HE表現內皮細胞標記（CD31）、平滑肌細胞標記（鈣調理蛋白）及外被細胞標記（NG2），且因此具有分化為內皮細胞、平滑肌細胞及外被細胞之能力。另外，當第6天的HE細胞轉移至支持外被細胞生長之培養基中時，CD140B表現略微減少，且NG2、CD90、CD73、CD44及CD274表現維持或增加（資料未展示）。

實施例5：單細胞miRNA圖譜

【0137】 如下文關於J1衍生之HB及HE所描述進行使用單細胞qRT-PCR分析以評估96種與多能性或血管細胞身分相關之微RNA的表現量之另外的分析。訂購TaqMan基因表現分析（Applied Biosystems）用於96種人類miRNA。藉由將25 μL 20× Taqman分析與25 μL 2×分析負載試劑（Fluidigm）混合得到50 μL體積的最終儲備液來準備10×分析。製備在66,000至250,000個細胞/毫升範圍內的細胞之等分試樣（冷凍或新鮮採集的）。細胞在室溫下與LIVE/DEAD染色溶液（LIVE/DEAD存活率/細胞毒性套組）一起培育10分鐘。隨後洗滌細胞，懸浮於培養基中且經由40 μm過濾器過濾。使用cellometer執行細胞計數得到存活率及細胞濃度。藉由將細胞（60 μL）與懸浮試劑（40 μL）（Fluidigm）以3:2之比率混

合製備細胞混合物。將6 μL細胞懸浮混合物裝載至中等細胞（10-17 μm）或較大細胞（17-25 μm）之預塗佈C1單細胞Autoprep IFC微流晶片上，且隨後在Fluidigm C1儀器上使用「STA: Cell Load(1782x/1783x/1784x)」腳本處理該晶片。此步驟在96個捕獲腔室中之各者中捕獲一個細胞。隨後將晶片轉移至Keyence顯微鏡且掃描各腔室以對單細胞捕獲之數目、細胞之存活/死亡狀態及所捕獲之二重峰/細胞聚集體評分。對於C1上之細胞裂解、逆轉錄及預擴增，根據製造商的方案將採集試劑、裂解最終混合物、RT最終混合物及預擴增混合物添加至C1晶片之指定孔中。隨後將IFC置放於C1中且使用「STA:miRNA Preamp（1782×/1783×/1784×）」腳本。將cDNA採集程序化以結束下一上午。將cDNA自C1晶片之各腔室轉移至預裝載有12.5 μL C1DNA稀釋試劑的新鮮96孔盤。根據製造商之說明製備管對照組（諸如無模板對照組及陽性對照組）用於各實驗。藉由qPCR使用96.96 Dynamic Array™ IFC及BioMark™ HD系統來分析預擴增cDNA樣本。按照製造商之方案執行預塗佈於JUNO儀器中之IFC的處理，隨後為cDNA樣本混合物之負載及10×分析。隨後將IFC置放於Biomark™ HD系統中且使用協定「GE96x96 miRNA Standard v1.pcl」執行PCR。使用由Fluidigm提供之即時PCR分析軟體執行資料分析。自分析移除死亡細胞、複製品等且使用基於線性導數基線及用戶偵測Ct臨限之方法用於分析。在Heatmap視圖中檢視資料且導出為CSV文件。隨後將「R」軟體用於執行產生「FSO」文件之「離群值鑑別」分析，且隨後遵循「自動分析」之說明書。

表5：miRNA標記圖譜

	J1	**J1-HE**	**J1-HB**	**HUVEC**
多能 miRNA				
367	+	-	-	-
302 a	+	-	-	-
302 b	+	-	-	-
302 c	+	-	-	-
血管 miRNA				
126	-	+	+	+
24	-	+	+	+

196-b	-	+	-	+
獨特 miRNA				
223	-	-	+	-
142-3p	-	-	+	-
214	-	+	-	-
199a-3p	-	+	-	-
335	-	+	-	-

結果

【0138】 如圖7中所示，與未分化胚胎幹細胞（J1）、人類血管細胞（HUVEC）及J1衍生之HB細胞相比，J1-HE細胞具有不同miRNA表現圖譜。miRNA標記之特定實施例展示於表5中。

實施例6：試管內分化為內皮細胞及血管形成

【0139】 進一步試管內測試衍生自J1及GMP-1之HE及HB分化為內皮細胞之能力。約30萬HE細胞及50萬-60萬HB再懸浮於18 mL EGM2或Vasculife VEGF培養基套組（Lifeline Cell Tech）中，且3 mL再懸浮液等分至纖維接合素塗佈之6孔盤（Corning）之各孔中。在培養物中兩天之後，更換培養基，且添加新鮮EGM2或Vasculife VEGF培養基。當細胞達至約60-70%匯合時拍攝圖片。HB（在第5天）及HE（在第3天）在纖維接合素塗佈之盤中分化為內皮細胞譜系，且兩者均顯示特徵內皮細胞卵石狀形態（資料未展示）。

【0140】 為測試血管形成，拍攝圖片之後採集細胞。簡言之，各孔用D-PBS洗滌，且將1 mL StemPro Accutase（Gibco）添加至各孔中且在37℃下培育3-5分鐘。藉由吸取幾次培養物生成單一細胞懸浮液。盤用EGM2培養基或Vasculife VEGF培養基洗滌，且轉移至錐形管中且以250 g離心5分鐘。使用Nexcelom Cellometer K2進行細胞計數。

【0141】 將250 μL基底膜基質膠（Corning）添加至NuncTM 4孔盤（Thermo Scientific）之各孔且在RT下培育盤30分鐘。所採集HB及HE以約5.0×10^4個細胞之

密度接種在每孔250 μL EGM2培養基或Vasculife VEGF培養基中。在塗鋪2-3小時之後，將培養基替換為新鮮的250 μL含有AcLDL（Molecular Probes）之培養基（5 μL AcLDL加上245 μL培養基）。在常氧條件下培育盤隔夜。在培育24小時之後，移除含AcLDL之培養基，將盤用D-PBS洗滌3次，且添加新鮮的250 μL EGM2培養基或Vasculife VEGF培養基/孔。最後，以4×放大倍數使用Keyence顯微鏡自各孔拍攝顯微照片。HB及HE兩者均在基質膠上形成血管類網路（資料未展示）。

實施例7：在肺動脈性高血壓模型中之活體內研究

【0142】 此研究之目的為評估造血內皮細胞對大鼠之Sugen-缺氧（SuHx）誘發之肺動脈性高血壓（PAH）之效果。研究亦評估造血內皮細胞對治療裸大鼠之SuHx誘發之肺性高血壓（PAH）的潛在功效。大鼠之SuHx誘發之肺性高血壓為充分記載之模型，且適用於研究抗高血壓劑對患有肺性高血壓之大鼠之肺動脈壓及右心室重塑的效果。

物種

【0143】 雄性裸（RNU）大鼠（Charles River Laboratories）在其參與研究時重200 g與250 g之間。

測試物品

【0144】 VPC1 =如以上實施例2中所製備之J1-HB

【0145】 VPC2 =如以上實施例1中所製備之J1-HE

媒劑（陰性對照組）

【0146】 蒸餾無菌水

製備Sugen溶液

【0147】 製備10 mg/mL之Sugen於DMSO中之溶液以用於在第0天投予。

實驗程序

【0148】 根據治療組之間之平均分佈基於其體重將動物隨機分組。

【0149】 使來自第2組至第8組（參見表6）之動物經歷sugen/缺氧/常氧方案21天。來自第1組之動物接受DMSO（sugen之媒劑）之注射，且使用同一協定經歷缺氧/常氧。在每天的基礎上觀測動物行為及一般健康狀態之任何變化。

【0150】 用測試物品或媒劑進行之治療按預定在第1天或第9天投予且描述於表6中。隨意給予食物及水。進行動物之行為及一般健康狀況之每天觀測。注意每週體重。

【0151】 在手術當天，用2至2.5%異氟醚USP（Abbot Laboratories, Montreal Canada）於氧氣中之混合物麻醉大鼠。血液動力學及功能性參數（全身性動脈血壓、右心室血壓、肺動脈血壓、氧飽和度及心跳速率）經連續地記錄5分鐘或直至肺動脈壓信號損失，以先到者為準。

【0152】 隨後將大鼠放血，且肺循環用0.9% NaCl沖洗。肺及心臟皆一起自胸腔移除。肺（左葉）用10% NBF充氣。在載玻片上製備左葉以對於組織病理學分析。切除心臟以量測右心室及包括隔膜之左心室之濕重作為Fulton指數之一部分。

表6：治療組指配及治療資訊

組編號	組描述	治療劑量	投藥途徑	治療注射日	手術日	組大小（n=）
1	常氧對照	n/a	n/a	n/a	第 21 天	5
2	SuHx +媒劑	n/a	靜脈內頸靜脈注射	第 1 天	第 21 天	8

3	SuHx + VPC1	2.5 M 個細胞	靜脈內頸靜脈注射	第 1 天	第 21 天	8
4	SuHx + VPC2	2.5 M 個細胞	靜脈內頸靜脈注射	第 1 天	第 21 天	8
5	SuHx+ VPC1	5.0 M 個細胞	靜脈內頸靜脈注射	第 1 天	第 21 天	8
6	SuHx + VPC1	2.5 M 個細胞	靜脈內頸靜脈注射	第 9 天	第 21 天	8
7	SuHx + VPC2	2.5 M 個細胞	靜脈內頸靜脈注射	第 9 天	第 21 天	8
8	SuHx + VPC1	5.0 M 個細胞	靜脈內頸靜脈注射	第 9 天	第 21 天	8

資料分析

【0153】 **心跳速率.**心跳速率經由連接至動物左前爪之N-595脈衝式血氧濃度器（Nonin, Plymouth, MN）量測。源自脈衝式血氧濃度器之心跳速率值使用游標讀數在Clampfit 10.2.0.14（Axon Instrument公司, Foster City, California, USA, [現為Molecular Devices公司])中按每分鐘跳動次數（bpm）量測。

【0154】 **飽和度（SO_2）.** 血氧飽和度（SO_2）自連接至動物前部爪之脈衝式血氧濃度器（Nonin, Plymouth, MN）信號讀出。飽和度值使用游標讀數在Clampfit 10.2.0.14中以百分比（%）量測。

【0155】 **動脈血壓.** 經由動脈內流體填充導管（AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA）在整個實驗中連續地記錄動脈血壓。舒張壓及收縮壓值使用游標讀數在Clampfit 10.2.0.14中以mmHg量測。使用下式計算平均動脈血壓值：

【0156】 平均值平均動脈壓=舒張壓+(收縮壓-舒張壓)/3

【0157】 脈搏壓經計算為收縮讀數與舒張讀數之間之差。

【0158】 **心室及肺血壓.** 經由心室內流體填充導管（AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA）記錄右心室及肺血壓。舒張壓及收縮壓值使用游標讀數在Clampfit 10.2.0.14中以mmHg量測。使用下式計算平均心室及肺血壓值：

【0159】 平均心室或肺壓=舒張壓+(脈搏壓/3)

【0160】 **Fulton指數.**在生理記錄結束時，移除各動物之肺及心臟。解剖心臟以使右心室與具有隔膜之左心室分離，且單獨稱重。隨後使用下式計算Fulton指數：

【0161】 $$\text{Fulton指數} = \frac{\text{右心室重量}}{\text{左心室+隔膜重量}}$$

【0162】 **統計分析.**值呈現為平均值± SEM（平均值之標準誤差）。單因數ANOVA及重複未配對史都登氏t檢定（Student's t-test）在Microsoft Excel 2007中按照所有實驗條件進行，比較治療組與對照、健康動物或Sugen-缺氧動物（媒劑）。當$p \leq 0.05$時，認為差異顯著。

【0163】 在整個結果中，*指示該值顯著不同於常氧對照組（第1組），而**指示該值顯著不同於SuHx對照組（第2組）。換言之，*指示動物顯著不同於健康動物，而**指示動物顯著不同於未受益於任何治療性治療之完全患病動物。

結果

【0164】 Sugen +缺氧（SuHx）誘發之PAH大鼠模型為廣泛使用的模型以研究肺動脈性高血壓。Sugen為VEGF受體拮抗劑，其已知會引起肺內皮細胞病灶，首先以此研究中所用之暴露含量（單次劑量為20 mg/kg）損害肺血管中約50%的內皮細胞。重塑受損內皮細胞及血管細胞以及血管收縮發生且阻塞肺小動脈，因此限制通過肺動脈的血流且增大肺動脈壓。通過肺動脈之血流減少及肺動脈壓增加會增加右心室後負荷，引起經SuHx處理之大鼠之顯著右心室肥大特徵的發展，且在罹患PAH之臨床患者中觀測到。

【0165】 在此研究中，所有僅SuHx +媒劑動物正如預期罹患中等至嚴重PAH。患病動物呈現所有PAH模型之特徵：肺壓（收縮壓、舒張壓及平均壓）在SuHx動物中與健康動物相比在統計學上較高（表7、8及9）。在值為41.2 mmHg

（表9）之情況下，對應於中等/嚴重發光體動脈性高血壓之較高範圍，平均肺壓在SuHx +媒劑動物中比健康動物中高3倍。

表7：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH率之收縮肺壓的效果

治療	收縮肺壓（mmHg）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	24.0	1.55	n/a	5
媒劑	66.6*	6.01	0.000	8
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	55.3	5.45	0.183	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	51.7	5.33	0.090	7
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	59.9	4.75	0.388	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	62.5	5.03	0.625	6
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	60.2	4.80	0.410	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	62.4	3.69	0.540	10

表8：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之舒張肺壓的效果

治療	舒張肺壓（mmHg）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	8.6	0.60	n/a	5
媒劑	28.5*	2.35	0.000	8
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	23.5	2.64	0.179	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	21.6**	0.90	0.022	7
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	28.6	1.91	0.985	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	25.5	0.85	0.310	6
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	26.2	1.93	0.455	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	26.5	1.38	0.452	10

表9：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之平均肺壓的效果

治療	平均肺壓（mmHg）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	13.7	0.64	n/a	5
媒劑	41.2*	3.34	0.000	8
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	34.1	3.55	0.166	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	31.6**	2.12	0.036	7
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	39.0	2.82	0.619	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	37.8	1.86	0.439	6
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	37.5	2.78	0.406	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	38.5	2.10	0.481	10

【0166】 肺壓升高引起右心室後負荷上升，此導致右心室（RV）肥大，如Fulton指數（右心室對比左心室比率）直接所示，其在SuHx媒劑組中比常氧健康組（第1組）中高2.7倍（表10）。PAH之特徵在於短期右心室肥大，在此期間心肌厚度顯著增加，隨後右心室長期擴張，伴隨有右心室纖維化。在21天之研究持續時間內，大鼠模型一般不夠長以至於無法觀測到顯著右心室擴張。在此研究中，Fulton指數增加明確指示右心室顯著肥大。此等資料亦指示藉由細胞注射對右心臟肥大之發展無效果。

表10：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之Fulton指數的效果

治療	Fulton 指數	SEM	p 值	n =
常氧對照組	0.219	0.06	n/a	5
媒劑	0.586*	0.05	0.000	8
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	0.602	0.04	0.470	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	0.608	0.03	0.373	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	0.568	0.03	0.849	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	0.568	0.03	0.858	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	0.585	0.03	0.630	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	0.657	0.02	0.072	10

【0167】 當脈搏壓高於收縮壓之25%時，該脈搏壓視為正常的。對於正常組，脈搏壓為收縮壓之26%。（表11）。對於SuHx +媒劑動物，脈搏壓降至收縮壓之22%。不認為Sugen缺氧誘發之PAH影響心肌收縮性；然而，因PAH而導致之不良氣體交換引起對左心室的雙相缺氧效果，此最終變成慢性缺氧且損失收縮性強度。

表11：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之脈搏壓的效果

治療	脈搏壓（mmHg）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	38.5	1.50	n/a	4
媒劑	25.4*	2.71	0.008	7
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	28.4	3.16	0.498	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	29.7	1.43	0.215	6
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	24.3	2.10	0.750	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	25.3	4.42	0.978	7

VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	28.3	1.68	0.357	9
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	27.2	1.98	0.596	9

【0168】 視為氧飽和度（SO_2）正常介於95%與100%之間。在對照組中，SO_2為98.6%；其在媒劑組中降至88.4%（表12），確認肺中設定之高血壓對全身性氧合有影響。

表12：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之SO_2的效果

治療	SO2（%）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	98.6	0.75	n/a	5
媒劑	88.4*	2.09	0.002	5
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	93.0	3.00	0.284	2
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	95.7**	0.33	0.041	3
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	92.7	1.57	0.122	7
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	92.3	3.33	0.340	4
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	91.3	2.55	0.455	9
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	94.6**	0.61	0.008	9

【0169】 在研究之21天內，正常健康大鼠增重68 g，而SuHx-媒劑動物平均增重21 g（表13）。隨著體重較慢增長，應出現相對較少的器官重量增加；然而，重塑及發炎/水腫造成器官重量增加，且因此，量測肺重量為估計發炎/水腫以及重塑之基本但快速的方式。經媒劑治療之大鼠之肺比正常大鼠中重1.8倍(表14)。肺重量顯著增加表明嚴重肺水腫、栓塞或纖維化，其所有亦表徵PAH。SuHx誘發之PAH之特徵在於肺血管之初始血管收縮，一些肺重量增加可歸因於此（血管平滑肌肥大）。

表13：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之重量增加的效果

治療	重量增加（g）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	68.0	19.53	n/a	5
媒劑	20.6*	6.47	0.019	8
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	25.1	4.42	0.442	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	15.4	8.94	0.720	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	26.7	5.84	0.389	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	17.6	4.39	0.831	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	23.1	4.26	0.608	10

VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	10.6	4.73	0.265	10

表14：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之肺重量的效果

治療	相對肺重量（%）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	0.589	0.02	n/a	5
媒劑	1.063*	0.07	0.000	8
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	1.095	0.08	0.901	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	1.227	0.08	0.179	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	1.128	0.07	0.615	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	1.130	0.08	0.647	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	0.967	0.06	0.196	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	1.270	0.07	0.054	10

【0170】 SuHx +媒劑之存活率經量測為80%；2/10的動物在手術日之前死亡（圖8）。此與此模型中RNU大鼠的內部歷史死亡率相容。

【0171】 **VPC1.** 在2個不同劑量：250萬個細胞及500萬個細胞下測試VPC1。各劑量在第1天注射至一組動物（分別為第3組及第5組），且在第9天注射至一組（分別為第6組及第8組）。在與SuHx非治療組相比時，所測試之劑量中無一者引起肺壓（收縮壓、舒張壓及平均壓）的統計顯著變化（表7、8及9）。因此，VPC1劑量中無一者顯著預防Fulton指數增大（表10），表明VPC1可能不能預防與PAH相關之右心室（RV）肥大。

【0172】 在與媒劑組相比時，VPC1治療的脈搏壓、平均動脈壓及心跳速率不變（表11、9及15）。

表15：VPC1及VPC2對sugen-缺氧誘發之PAH大鼠之心跳速率的效果

治療	心跳速率（bpm）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	376.0	14.97	n/a	4
媒劑	299.4*	14.30	0.007	7
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	326.4	13.03	0.186	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	325.8	22.92	0.335	6
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	317.8	9.90	0.294	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	334.7	16.37	0.132	6

VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	296.4	13.89	0.884	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	311.6	12.30	0.531	10

【0173】 陰性對照SuHx組中之SO_2為88%，此值低於正常飽和範圍（95%至100%）（表12）。在第1天以2.5 M及5 M個細胞用VPC1治療之組中之SO_2分別為93%及92%，略高於陰性對照組（表12）。在第9天以5 M個細胞用VPC1治療之組中，SO_2為95%（表12）,其在被視為正常及健康動物的範圍內。

【0174】 與媒劑組相比，相對肺重量在VPC1治療組中不改變（表14），表明VPC1可能不能預防肺纖維化及/或相關水腫。

【0175】 在研究之21天內，正常健康大鼠增重68 g，而僅SuHx（媒劑組）動物平均增重21 g（表13）。接受VPC1治療之動物之重量增加不比媒劑組多（表13）。

【0176】 用媒劑治療之組之存活率為80%，而在第1天以2.5 M個細胞及在第9天以5 M個細胞用VPC1治療之組之存活率為100%（圖8）。

【0177】 動物之存活率以及一般健康及生理參數表明，在第1天或第9天注射的250萬個細胞之劑量下的VPC1在大鼠中對SuHx誘發之PAH無顯著效果。在第9天注射之500萬個細胞之劑量似乎還提供較小效益，如血紅素之氧飽和度增加及動物存活率增加所示。

【0178】 應注意，動物未呈現作為注射VPC1之結果的任何不耐受性或副作用。除與PAH相關之症狀外，籠側觀測結果未揭示動物的任何不適。

【0179】 **VPC2.** 在250萬個細胞之劑量下測試VPC2。細胞在第1天注射至一組動物（第4組），且在第9天注射至一組（第7組）。

【0180】 當與媒劑動物相比時，第1天用VPC2治療之組中之收縮肺壓、舒張肺壓及平均肺壓在統計學上較低（分別低22%、24%及23%）（表7、8及9）。此表明，在第1天注射的250萬個細胞下的VPC2藉由預防組織重塑及/或預防由

sugen-缺氧及其損害內皮細胞引起的肺動脈血管收縮允許更佳的血流通過肺動脈。

【0181】 然而，Fulton指數增大（表10）表明，VPC2對動物之血流動力學的效果不足以預防與PAH相關之右心室（RV）肥大。此外，與僅用媒劑治療之組相比，利用VPC2治療（在第1天或在第9天）之組中的脈搏壓、平均動脈壓及心跳速率在統計學上無不同（表11、9及15）。

【0182】 陰性對照SuHx組中之SO_2為88%，此值低於正常飽和範圍（95%至100%）。在第1天以2.5 M用VPC2治療之組中的SO_2回至正常值範圍，在統計學上及臨床上具有顯著效益（表12）。

【0183】 與媒劑組相比，相對肺重量在用VPC2治療之組中在統計學上不顯著（表14）。

【0184】 接受VPC2之動物的重量增加並未不同於接受媒劑之動物的重量增加（表13）。僅用媒劑治療之組的存活率為80%，而在第1天或第9天以250萬個細胞用VPC2治療之組中的存活率為100%（圖8），表明VPC2在一定程度上保護動物免於罹患PAH。

【0185】 動物的肺壓降低、較佳飽和度以及較高存活率表明VPC2在大鼠中在SuHx誘發之PAH中提供一些效益。

討論

【0186】 此肺動脈性高血壓研究涉及RNU大鼠，其已發現在此等實驗條件下罹患非常嚴重及快速形式的PAH。發現此研究中所用之最終實驗條件會引起動物的嚴重肺血流動力障礙，同時在21天內維持死亡率低於20%。

【0187】 在不到3週之後的疾病進展速度及症狀嚴重程度受到關注；在疾病進展如此迅速的情況下，對動物產生任何治療效益呈現重大挑戰。儘管可設想

有效的血管擴張劑可預防疾病發作及其早期進展，但此研究中之測試物品之作用機制不利於此類快速研究。

【0188】 儘管如此，在第1天注射250萬個VPC 2細胞仍會降低收縮肺壓、舒張肺壓及平均肺壓，後者自41.2 mmHg降至31.6 mmHg，此具有統計學上顯著之效益，且更重要地，使動物之平均肺壓回至正常身體活動保持可能性的範圍（25至35 mmHg）。與氧飽和度增加組合，此表明在第1天投予之250萬VPC 2細胞可顯著改善肺血流動力學，且移除持續缺氧，其在臨床PAH患者中引起慢性缺血及肺重塑。

【0189】 此外，研究之功能性端點之檢查揭示VPC 1與VPC 2之間之差異：在所有情況下，在第1天以250萬密度注射之VPC 2細胞產生優於在同一天注射250萬VPC 1細胞的結果。此為出人意料的，因為HB先前展示在鼠類後肢缺血模型中及在鼠類心肌梗塞模型中具有效果。參見美國專利第9,938,500號。此外，當考慮到所量測肺血流動力學及所有其他功能性參數時，在第1天注射250萬VPC 2細胞比在第9天注射250萬VPC 2細胞產生更佳結果。

【0190】 總而言之，此研究證實VPC2（HE）細胞在涉及RNU大鼠之極其侵襲性及快速誘發之PAH症候群中的功效。雖然存在一些關於免疫缺乏患者之PAH之嚴重程度較大的報導，但與此研究中所誘發之PAH一樣快速及嚴重的進展在臨床中未知。考慮到更多時間及較不極端的肺動脈性高血壓，預期與單次IV注射VPC 2細胞（HE）相關之功能性效益將比當前資料集建議的更有利。

實施例8：組織病理學分析

【0191】 肺動脈性高血壓之特徵在於肺動脈壓顯著及持續升高。因肺病或動物模型中氧可用性降低之其他原因所致的慢性肺泡缺氧導致肺血管阻力持續增大及肺性高血壓。多種因素涉及PAH之病理學，其中肺血管壁之持續血管收縮

及重塑似乎最重要。雖然血管收縮為平滑肌細胞對多種刺激的可逆反應，但其在維持重塑中為必需的，該重塑在血管壁之所有層中發生，且最終導致更加永久的內腔直徑限制。

【0192】 在此研究中，在實施例7中所測試之動物中分析各種參數以判定所測試造血內皮細胞是否干擾結構病灶之發展，此表徵PAH模型中之肺血管變化。

材料及方法

【0193】 在送至加拿大魁北克蒙特利爾的免疫學及癌症研究院（The Institute for Research in Immunology and Cancer in Montreal, Quebec, Canada；IRIC）製造用於組織病理學分析之載玻片之前，用10%福馬林灌注及固定自每個實驗組（示於表6中）中之每隻大鼠採集的肺左葉。

【0194】 將中間左葉之橫向部分切割且包埋於石蠟中，以5 μm厚度切片，安放且用蘇木精及伊紅（Hematoxylin and Eosin，H&E）染色。

【0195】 在Nikon Eclipse T100顯微鏡上以200×放大率目測各切片。隨機選擇最少每個肺10個非重疊視野。使用Nikon DS-Fi1數位相機使用Nikon NIS元件4.30拍攝顯微照片。給定大鼠及所關注之特點，攝影者對治療為盲目的。對於10個視野，拍攝及保存每一區域之單一良好聚焦的顯微照片。在血管尺寸無臨限值或限制的情況下，自最大至最小分析各視野中發現之所有血管。

【0196】 鑑別腺泡內血管，亦即與肺泡、肺泡導管及呼吸道細支氣管相關之肺之氣體交換區域內的血管。排除與末端細支氣管及所有較大氣管相關之所有血管。

【0197】 藉由量測橫斷內腔之最長軸，基於內腔直徑將血管分為三個尺寸組：小（10-50微米）、中等（50-100微米）或大（>100微米）。在與血管長軸垂直

量測之內腔最寬點使用「Infinity Analyze 5.0.3.」來量測直徑。內腔位於內彈性薄層之內邊緣之間，亦即內彈性薄層未形成內腔部分，但被視為血管壁之一部分。

【0198】 各血管亦分為非肌肉、半肌肉或肌肉。

【0199】 *完全肌肉*.由如藉由染色所鑑別之平滑肌層及由內部及外部彈性薄層完全包圍（>90%圓周）。在肌化血管中，在與在非肌肉血管中量測內徑相同的位置處量測外徑，且自外邊緣起延至外部彈性薄層之相對外邊緣。

【0200】 *部分肌肉*:由平滑肌之新月形及兩個彈性薄層不完全地圍繞圓周之一部分（10-90%圓周）。在部分肌化血管中，在與在非肌肉血管中量測內徑相同的位置處量測外徑，且在彼位置處自外邊緣延至最外部彈性薄層之相對外邊緣（無論此為內部或外部彈性層）。

【0201】 *非肌肉*：血管之所有圓周之單個彈性薄層（<10%），無明顯平滑肌層。

分析

【0202】 值呈現為平均值± SEM（平均值之標準誤差）。重複未配對史都登氏*t*檢定按照所有實驗條件進行，比較以下組：

【0203】 SuHx組（陰性對照組）動物與健康動物（常氧對照組）進行比較以確認成功誘發疾病。治療組與陰性對照動物（SuHx）。當$p \leq 0.05$時差異視為顯著的。

【0204】 在整篇中，*指示該值顯著不同於對照（無SuHx）組，而**指示該值顯著不同於陰性對照（SuHx）組。

結果

Sugen效果

【0205】 注射Sugen引起小的肺內側與外膜增厚與嚴重動脈病之組合，包括同心新生血管內膜及複雜葉狀病灶。觀測到兩種模式的複雜病灶形成：一種為病灶形成於血管內腔內，且另一種突出至血管外部（動脈瘤狀）。PAH之Sugen誘發之第三結構後果在疾病進展中發展得晚得多，且由肺軟組織內之纖維化之出現組成。臨床前Sugen誘發之PAH不為纖維化模型本身，但晚期嵌入型及染色組織之仔細檢查允許纖維化之可靠檢核。纖維化之出現指示不可逆PAH，諸如在長期受苦的患者中觀測到。不幸地，此等患者往往會對PAH之血管擴張劑療法之當前收穫無反應。

【0206】 選擇小的肺動脈及小動脈之壁厚、血管分類、圍繞此等動脈之增殖性細胞（祖細胞）群體及動脈內腔之相對直徑以測定介於健康與PAH肺之間可觀測的形態測定學變化的強度。單核發炎細胞（肺泡巨噬細胞）及白血球（淋巴球樣細胞及嗜酸性球之團簇）浸潤在肺中、肺中之隙間/肺泡水腫及纖維化以及葉狀病灶亦用作肺病理生理學狀態之指數。

【0207】 組織病理學變化之強度經評分為0至3，其中0=無，1=輕度，2=中度，且3=嚴重，該等組織病理學變化諸如內側動脈增厚、「祖細胞」浸潤在小動脈外膜中及肺泡巨噬細胞浸潤在肺軟組織中、肺泡水腫及纖維化及葉狀病灶形成。

【0208】 動脈尺寸、內腔直徑、小動脈肌化存在或不存在自用VPC1及VPC2治療之SuHx誘發之PAH大鼠以及表6中所示之陰性對照動物的肺彙集。

陰性對照大鼠

【0209】 正如預期，對照（常氧）動物之肺組織主要由非肌肉小動脈（88.3%）構成（表16、17及18）。相比之下，陰性對照（SuHx）動物之肺組織主要由肌肉小動脈（83.9%）構成（表16、17及18）。此觀測與史泊格多利大鼠

（Sprague-Dawley rat）中之56天的Sugen缺氧模型中觀測到的增生一致。在Sugen注射之後在17%氧氣下缺氧11天足以導致恆定肺血管平滑肌（VSM）收縮，其導致VSM肥大及增生，其中VSM細胞倍增通常使非肌肉小動脈變為部分或完全肌化小動脈。此增大壁厚且減少彼等血管中之內腔空間。另外，由於肺平滑肌重塑，在常氧環境中以下10天仍在肺內維持缺氧條件。研究之缺氧階段之特徵在於快速內皮細胞增殖，其產生各種等級之葉狀病灶。在21天結束時，彼等病灶通常足夠大以完全覆蓋小直徑的小動脈。

表16：VPC1及VPC2對SuHx誘發之PAH大鼠之非肌肉血管之百分比的效果

治療	非肌肉血管（%）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	88.32	1.99	n/a	5
媒劑	7.45*	1.07	0.000	10
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	25.45**	5.36	0.004	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	46.43**	4.88	0.000	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	20.21**	5.48	0.028	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	14.52**	2.62	0.016	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	14.75**	2.01	0.005	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	14.94**	1.99	0.004	10

表17：VPC1及VPC2對SuHx誘發之PAH大鼠之肌肉血管之百分比的效果

治療	肌肉血管（%）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	4.78	1.58	n/a	5
媒劑	83.93*	2.55	0.000	10
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	63.73**	5.09	0.002	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	44.99**	5.11	0.000	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	69.00**	6.38	0.037	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	78.38	3.37	0.199	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	77.14	2.08	0.054	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	77.26	2.53	0.080	10

表18：VPC1及VPC2對SuHx誘發之PAH大鼠之半肌肉血管之百分比的效果

治療	半肌肉血管（%）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	6.91	1.29	1.29	5

媒劑	8.62	1.85	1.85	10
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	10.82	1.44	1.44	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	8.57	1.86	1.86	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	10.78	1.54	1.54	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	7.10	1.23	1.23	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	8.11	0.58	0.58	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	7.80	0.78	0.78	10

【0210】 在對照（常氧）組中，大部分血管（約88%」表徵為「小」尺寸（直徑小於50微米），且主要為非肌肉（表16、17及18）。幾乎12%之血管描述為「中等」尺寸，而其餘的極少血管被視為「大」的。SuHx之PAH誘發改變血管厚度，引起血管基於尺寸的分佈變化（在研究結束時約60%表徵為小血管，38%表徵為中等血管，且其餘的表徵為大血管）。由SuHx誘導之變化在血管內之肌肉層增厚中很明顯（如表19、20及21中所示）；與對照（常氧）動物相比，小尺寸及中等尺寸的肺血管分別使其肌肉組織顯著增大16%至42%及20%至33%。大血管之壁厚未顯著變化。

表19：VPC1及VPC2對SuHx誘發之PAH大鼠之小血管壁厚的效果

治療	小血管壁厚（%）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	16.35	0.97	n/a	5
媒劑	41.92*	1.98	0.000	10
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	31.78**	2.36	0.004	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	25.68**	1.73	0.000	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	34.81**	2.69	0.045	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	39.16	1.98	0.344	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	40.03	1.33	0.439	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	38.70	1.45	0.206	10

表20：VPC1及VPC2對SuHx誘發之PAH大鼠之中等血管壁厚的效果

治療	中等血管壁厚（%）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	20.06	0.96	n/a	5
媒劑	33.18*	1.08	0.000	10
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	32.24	1.35	0.594	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	28.58	1.96	0.055	10

VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	31.08	1.75	0.311	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	32.42	1.75	0.657	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	34.14	1.28	0.577	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	34.97	0.94	0.228	10

表21：VPC1及VPC2對SuHx誘發之PAH大鼠之大血管壁厚的效果

治療	大血管壁厚（%）	SEM	p 值	n =
常氧對照組	n/a	n/a	n/a	5
媒劑	23.42	2.10	n/a	10
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	17.74	2.87	0.149	10
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 1 天注射	19.07	1.67	0.143	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 1 天注射	21.44	5.29	0.715	9
VPC1，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	22.55	1.58	0.762	8
VPC2，2.5 M 個細胞，在第 9 天注射	20.74	3.38	0.520	10
VPC1，5 M 個細胞，在第 9 天注射	25.98	2.13	0.427	10

【0211】 壁厚增加會減小動脈之內腔直徑，增大右心室必須抗其泵送之肺動脈壓（右心室後負荷）。

【0212】 葉狀病灶在健康、未誘發動物中未觀測到。相比之下，用Sugen誘發但未受益於任何治療之動物呈現2級及3級葉狀病灶，此對應於中度（2級）至一些血管內腔完全閉塞之重度內皮細胞過度生長（3級）。除其特徵為人類PAH之葉狀病灶之外，未受益於治療之動物亦呈現纖維化及隙間/肺泡水腫之病徵。

VPC1

【0213】 在2個不同劑量：250萬個細胞及500萬個細胞下測試VPC1。各劑量在第1天注射至一組動物，且在第9天注射至一組。

【0214】 正如PAH誘發基於尺寸改變血管之分佈，用VPC1進行之治療亦基於尺寸改變血管之分佈。與僅SuHx大鼠（資料未展示）相比，VPC1略微增大「小」尺寸的血管且減小「中等」尺寸的血管。

【0215】 與經媒劑治療之大鼠相比，在第1天以2.5 M及5 M個細胞用VPC1

治療之大鼠之小肺血管之壁厚（主要由平滑肌層之厚度決定）在統計學上較低。中等及大血管之壁厚未顯著變化（表19、20及21）。在第9天用VPC1進行之治療對血管壁厚無任何效果。

【0216】 肌肉血管之百分比在第1天以2.5及5 M細胞經VPC1治療之動物中顯著較低；自經陰性對照SuHx治療之動物的83.9%降低至經VPC1治療之動物的分別為64%及69%（表16、17及18）。

【0217】 在第9天注射之VPC1之相同劑量對肺組織中之肌肉血管之百分比無統計學上顯著之效果。

【0218】 另外，在第1天用VPC1治療之組中觀測到的肺泡巨噬細胞浸潤、水腫/纖維化及肺動脈病灶少於媒劑動物。在第1天用VPC1治療之組中之葉狀病灶分類為輕度/中度（1至2分）。

VPC2

【0219】 在250萬個細胞之劑量下測試VPC2。細胞在第1天注射至一組動物，且在第9天注射至一組。

【0220】 正如PAH誘發基於尺寸改變血管之分佈，在第1天用VPC2進行之治療亦基於尺寸改變血管之分佈。與SuHx大鼠相比，在第1天注射之VPC2增加「小」尺寸的血管之數量，且減少「中等」尺寸的血管。在第1天用VPC2進行之治療使「小」尺寸的血管對比「中等」尺寸及「大」尺寸的血管之比例非常接近常氧極佳健康的大鼠中觀測到的比例。

【0221】 在第1天以2.5 M個細胞用VPC2治療之大鼠之小肺血管的壁厚與經媒劑治療之大鼠相比在統計學上較小。在第9天投予之VPC2對血管壁厚無任何效果。中等及大血管之壁厚未顯著變化（表19、20及21）。在第9天用VPC2進行之治療對血管壁厚無任何效果。

【0222】　肌肉血管之百分比在第1天用VPC2治療之動物中顯著較低；自經媒劑治療之動物的83.9%降低至經VPC2治療之動物的45%。因此，非肌肉血管之百分比自7%增大至46%。第9天之VPC2對肌肉血管無顯著效果。參見表16、17及18。

【0223】　此等結果確認功能性結果，其顯示PAH在SuHx誘發之動物中之症狀在用VPC2治療之動物中較不嚴重得多。VPC2預防SuHx誘發之PAH大鼠模型中之肺血管的重塑。

【0224】　另外，在經VPC2治療之動物中觀測到的肺泡巨噬細胞浸潤、水腫/纖維化及肺動脈病灶在陰性對照SuHx動物中低得多，分類為無/輕度（0至1分），表明VPC2預防與PAH相關之肺變化發作。

【0225】　此研究證實VPC2（HE）對RNU大鼠中之極其侵襲性及快速誘發之PAH症候群中的功能性以及結構結果的高功效。

實施例9：HE含有為VECAD+之不同血管內皮細胞部分

【0226】　以上流動式細胞測量術及轉錄物分析指示可能存在由HE分化方案生成之顯著血管內皮細胞組分。為更好地定義PSC衍生之EC樣細胞與成熟EC之間的類似性及差異，吾等執行單細胞RNA定序，比較HE、HUVEC及未分化iPSC（GMP1）。

【0227】　不受監督的簇聚揭示在所測試細胞類型中的9個團簇（圖9A）。正如預期，未分化iPSC自HE細胞（「VPC餵養層活性」）及HUVEC（圖9B及9C）清楚地簇聚。HE經組織成多個團簇，但總體而言，在群體中iPSC與HUVEC大部分可分離。當詢問血管內皮細胞之特異性標記之表現時，藉由VECAD/CDH5之存在鑑別出三個團簇（團簇2、4及5）（圖10）。團簇2及4主要由HUVEC構成，而團簇5由HE細胞構成（圖9B）。鑒於團簇5似乎包含VECAD+細胞，比較來自團簇5

之VECAD+ HE細胞與來自其他團簇之細胞進行不同的基因表現分析，且發現團簇5具有強血管內皮細胞特徵，如由最差異性表現之基因之功能指示（表22）。團簇5中50個最顯著上調之基因中的大多數為具有已知血管表現及活性的基因，且包括PLVAP、GJA4、ESAM、EGFL7、KDR/VEGFR2、ESAM及VECAD（CDH5）（表22）。基因本體分析指示，在最富集路徑中的為EC遷移、內皮發育、萌發血管新生及其他EC相關製程。類似地，基因集富集分析揭示對內皮發育及功能重要的路徑，包括TGFβ信號傳導及缺氧。

【0228】 簇聚分析亦顯示HE細胞很大程度上不同於HUVEC。團簇5具有極小但非零HUVEC貢獻，且團簇2及4主要由HUVEC構成，其中小（<15%）HE圖示（圖9B）。比較團簇5與主要由HUVEC構成之團簇的不同的基因表現分析揭示團簇5中之VECAD+ HE細胞為不成熟的或祖細胞EC（表23）。在VECAD+ HE細胞中更高度表現之基因中的為SOX9、PDGFRA、及EGFRA，其為先於最終分化之EC的複製型血管攜帶的祖細胞血管細胞之標記。比較內皮菌落形成細胞（ECFC）與成熟血管攜帶的內皮細胞（EC）之近期研究（Kutikhin, A. G.等人 *Cells* 9:876 (2020)）將KDR/VEGFR2、NOTCH4及膠原蛋白I及IV次單元鑑別為ECFC富集因子，且與HUVEC相比，彼等轉錄物在團簇5之VECAD+ HE細胞中類似地上調，但諸如CD34之其他ECFC富集基因在HE細胞中不較高。儘管HE細胞及HUVEC表現VECAD/CDH5及PECAM1/CD31，HUVEC含量仍較高，其同樣與作為更不成熟或祖細胞EC樣細胞的HE細胞一致。使用在VECAD+ HE細胞與HUVEC之間差異性表現之基因集的基因本體分析指示最富集路徑為固醇生物合成、蛋白激酶A信號傳導、消化道及心肌心室發育。當與iPSC相比時，基因集富集分析揭示差異性表現之基因與對內皮發育及穩定重要的路徑相關，諸如MTORC1、WNT及TGFβ信號傳導。綜合而言，單細胞RNA定序揭示HE之團簇與HUVEC類似，具有真實EC之品質，且亦具有表明不成熟或祖細胞表現型之獨特

特徵。

表22.與其他團簇中之細胞相比，團簇5中之50個最顯著上調的基因

基因	p_val	p_val_adj	avg_logFC	pct.1	pct.2
GJA4	0.00E+00	0.00E+00	1.739765	0.751	0.171
PLVAP	0.00E+00	0.00E+00	1.710396	0.96	0.497
IGFBP4	0.00E+00	0.00E+00	1.483074	0.987	0.675
FCN3	0.00E+00	0.00E+00	1.425734	0.581	0.1
GNG11	0.00E+00	0.00E+00	1.184349	0.973	0.682
ESAM	0.00E+00	0.00E+00	1.128435	0.898	0.389
SLC9A3R2	0.00E+00	0.00E+00	1.100179	0.805	0.394
CDH5	0.00E+00	0.00E+00	1.046682	0.738	0.164
IGFBP5	0.00E+00	0.00E+00	1.044824	0.455	0.221
SOX18	0.00E+00	0.00E+00	1.014948	0.682	0.161
KDR	0.00E+00	0.00E+00	0.980832	0.949	0.669
GMFG	0.00E+00	0.00E+00	0.97714	0.835	0.269
HLA-E	0.00E+00	0.00E+00	0.959084	0.891	0.491
MMRN2	0.00E+00	0.00E+00	0.938295	0.666	0.121
VAMP5	0.00E+00	0.00E+00	0.914077	0.921	0.612
ARHGDIB	0.00E+00	0.00E+00	0.887378	0.825	0.394
ADGRL4	0.00E+00	0.00E+00	0.883791	0.703	0.231
GJA5	0.00E+00	0.00E+00	0.862907	0.524	0.132
EFNB2	0.00E+00	0.00E+00	0.862327	0.674	0.377
PECAM1	0	0	0.846013	0.654	0.17
RNASE1	0.00E+00	0.00E+00	0.829217	0.518	0.226
ECSCR	0.00E+00	0.00E+00	0.79933	0.687	0.176
ABHD17A	0.00E+00	0.00E+00	0.769739	0.854	0.568
HSPG2	0.00E+00	0.00E+00	0.760038	0.65	0.323
FAM107B	0.00E+00	0.00E+00	0.758576	0.682	0.309
EGFL7	0.00E+00	0.00E+00	0.754544	0.991	0.91
MEF2C	0.00E+00	0.00E+00	0.747243	0.745	0.343
ARGLU1	0.00E+00	0.00E+00	0.743373	0.794	0.693
FLT1	0.00E+00	0.00E+00	0.737392	0.968	0.891
S100A16	0.00E+00	0.00E+00	0.728981	0.967	0.819
CFLAR	0.00E+00	0.00E+00	0.726916	0.783	0.423
COTL1	0.00E+00	0.00E+00	0.725018	0.918	0.741
SOX17	0.00E+00	0.00E+00	0.72092	0.486	0.153
DLL4	0	0	0.709932	0.483	0.079
PLK2	0.00E+00	0.00E+00	0.709154	0.862	0.584
SLC2A1	0.00E+00	0.00E+00	0.699951	0.759	0.614
ITM2B	0.00E+00	0.00E+00	0.696128	0.982	0.942
CXCR4	0.00E+00	0.00E+00	0.68996	0.513	0.36
RAMP2	0.00E+00	0.00E+00	0.686508	0.704	0.488
FAM69B	0.00E+00	0.00E+00	0.681908	0.89	0.622
FKBP1A	0.00E+00	0.00E+00	0.681477	0.959	0.874
PTP4A3	0.00E+00	0.00E+00	0.680399	0.65	0.376
SERPINB6	0.00E+00	0.00E+00	0.676227	0.91	0.792
CD9	0.00E+00	0.00E+00	0.673737	0.783	0.543

PLXND1	**0.00E+00**	**0.00E+00**	**0.672561**	**0.728**	**0.443**
CAVIN1	**0.00E+00**	**0.00E+00**	**0.671818**	**0.779**	**0.476**
ENG	**0.00E+00**	**0.00E+00**	**0.671153**	**0.575**	**0.205**
THY1	**0.00E+00**	**0.00E+00**	**0.6667**	**0.765**	**0.53**
RASIP1	**0.00E+00**	**0.00E+00**	**0.665168**	**0.66**	**0.248**
HEY1	**0.00E+00**	**0.00E+00**	**0.662962**	**0.746**	**0.45**

表**23.**與**HUVEC**細胞相比，團簇**5**中之**100**個最顯著上調的基因

基因	p_val	p_val_adj	avg_logFC	pct.1	pct.2
CRHBP	**0**	**0**	**3.333906**	**0.983**	**0.005**
PLVAP	**0**	**0**	**2.660275**	**0.96**	**0.105**
HAPLN1	**0**	**0**	**2.582318**	**0.979**	**0.004**
CD24	**0**	**0**	**2.117768**	**0.895**	**0.011**
FLT1	**0**	**0**	**2.095663**	**0.968**	**0.366**
IGFBP2	**0**	**0**	**2.040781**	**0.997**	**0.702**
CKB	**0**	**0**	**2.020425**	**0.941**	**0.027**
GJA4	**0**	**0**	**1.891513**	**0.751**	**0.172**
SLC2A3	**0**	**0**	**1.787711**	**0.903**	**0.118**
S100A4	**0**	**0**	**1.737065**	**0.75**	**0.02**
KRT8	**0**	**0**	**1.687879**	**0.973**	**0.617**
FCN3	**0**	**0**	**1.686621**	**0.581**	**0.004**
IGFBP5	**0**	**0**	**1.620931**	**0.455**	**0**
LAPTM4B	**0**	**0**	**1.544365**	**0.966**	**0.497**
BNIP3	**0**	**0**	**1.531254**	**0.967**	**0.661**
KRT19	**0**	**0**	**1.512069**	**0.89**	**0.271**
ITM2C	**0**	**0**	**1.506945**	**0.879**	**0.033**
SLC2A1	**0**	**0**	**1.503243**	**0.759**	**0.119**
TUBB2B	**0**	**0**	**1.4743**	**0.841**	**0.005**
KDR	**0**	**0**	**1.443674**	**0.949**	**0.512**
LDHA	**0**	**0**	**1.41049**	**0.997**	**0.843**
APOE	**0**	**0**	**1.407249**	**0.726**	**0.029**
THY1	**0**	**0**	**1.388232**	**0.765**	**0.009**
FAM162A	**0**	**0**	**1.381927**	**0.908**	**0.519**
CRABP2	**0**	**0**	**1.351647**	**0.723**	**0.003**
ID1	**0**	**0**	**1.323672**	**0.977**	**0.659**
COL3A1	**0**	**0**	**1.298193**	**0.694**	**0.027**
NTS	**0**	**0**	**1.290051**	**0.536**	**0.002**
TXNIP	**0**	**0**	**1.254997**	**0.75**	**0.323**
QPRT	**0**	**0**	**1.25253**	**0.756**	**0.003**
SLC16A3	**0**	**0**	**1.225941**	**0.91**	**0.402**
ENO1	**0**	**0**	**1.207866**	**1**	**0.969**
TIMP3	**0**	**0**	**1.196902**	**0.737**	**0.084**
GYPC	**0**	**0**	**1.193327**	**0.835**	**0.185**
HEY1	**0**	**0**	**1.193009**	**0.746**	**0.095**
TMEM141	**0**	**0**	**1.18403**	**0.887**	**0.621**
COL6A2	**0**	**0**	**1.181263**	**0.756**	**0.026**
HES4	**0**	**0**	**1.17592**	**0.805**	**0.402**

CD44	0	0	1.170072	0.799	0.217
PGK1	0	0	1.169827	0.98	0.824
BST2	0	0	1.162566	0.807	0.555
CLEC11A	0	0	1.16185	0.822	0.25
SLC9A3R2	0	0	1.156233	0.805	0.533
KRT18	0	0	1.136732	0.994	0.892
FBLN1	0	0	1.116144	0.739	0.006
PCAT14	0	0	1.113903	0.629	0
MSMO1	0	0	1.108676	0.849	0.418
HMGCS1	0	0	1.094925	0.791	0.274
CXCR4	0	0	1.086418	0.513	0.104
TPI1	0	0	1.079699	0.999	0.973
PTP4A3	0	0	1.071418	0.65	0.054
ITM2B	0	0	1.05799	0.982	0.911
TMEM100	0	0	1.05409	0.569	0.001
MVD	0	0	1.049627	0.797	0.343
GJA5	0	0	1.03821	0.524	0.013
BAMBI	0	0	1.031801	0.658	0.043
HOPX	0	0	1.026231	0.681	0.174
APOC1	0	0	1.024475	0.704	0.128
SERPINB1	0	0	1.021549	0.799	0.435
PGAM1	0	0	1.01222	0.986	0.887
POMP	0	0	1.010744	0.989	0.966
TUBA1A	0	0	1.007929	0.956	0.901
ACAT2	0	0	1.007418	0.831	0.507
BEX1	0	0	0.998364	0.615	0.009
PRTG	0	0	0.995446	0.682	0.108
P4HA1	0	0	0.991764	0.731	0.207
SERPINE2	0	0	0.977086	0.666	0.073
ID3	0	0	0.97512	0.988	0.923
CYBA	0	0	0.970771	0.925	0.669
EFNB2	0	0	0.964464	0.674	0.362
PKM	0	0	0.9469	0.995	0.911
UNC5B	0	0	0.927982	0.571	0.012
COL4A1	0	0	0.925096	0.926	0.711
IGDCC3	0	0	0.921767	0.578	0
ARGLU1	0	0	0.915778	0.794	0.67
GJA1	0	0	0.909177	0.805	0.616
LIMD2	0	0	0.908494	0.866	0.562
GMFG	0	0	0.90607	0.835	0.453
FDX1	0	0	0.904597	0.784	0.479
FDFT1	0	0	0.895682	0.884	0.648
JUND	0	0	0.887796	0.908	0.638
SERPING1	0	0	0.875879	0.592	0.002
BEX3	0	0	0.875878	0.977	0.633
ANGPTL4	0	0	0.869906	0.548	0.041
PLK2	0	0	0.867144	0.862	0.556
CA2	0	0	0.865318	0.512	0
HLA-DRB1	0	0	0.85335	0.545	0
PLIN2	0	0	0.843637	0.711	0.348

COTL1	0	0	0.841217	0.918	0.775
ABHD17A	0	0	0.840353	0.854	0.601
IGFBP4	0	0	0.836	0.987	0.956
SERPINH1	0	0	0.832031	0.923	0.818
C4orf3	0	0	0.829329	0.947	0.852
IER2	0	0	0.826343	0.848	0.569
S100A11	0	0	0.825409	0.995	0.992
FURIN	0	0	0.824346	0.724	0.369
CSRP2	0	0	0.820907	0.665	0.17
TIMP1	0	0	0.819248	0.973	0.904
TCEAL9	0	0	0.816856	0.904	0.546
FSCN1	0	0	0.811547	0.963	0.879

實施例10：HE減弱肺動脈性高血壓之大鼠模型中之血液動力學參數及血管重塑

【0229】 用野百合鹼（monocrotaline；MCT）處理嚙齒動物誘發血管阻力及心肌功能障礙（Rabinovitch, M. *Toxicol Pathol* **19**, 458-469 (1991)），且Sugen/缺氧模型誘發前述臨床標記以及形成葉狀病灶，其為人類晚期疾病之臨床標誌（Ciuclan, L.等人*Am J Respir Crit Care Med* **184**, 1171-1182 (2011)）。

【0230】 在MCT大鼠中，用衍生自J1-ESC及GMP-1 iPSC兩者之HE進行之治療減弱PAH之症狀。簡言之，在第0天給予rnu/rnu大鼠單次劑量之MCT（50 mg/kg，ip）。三天後，將大鼠分為媒劑、J1-HE及GMP-1 HE組且經由靜脈內注射給藥對照培養基或細胞（2.5×10^6個）。作為陽性對照，在其飲用水中給予另一組高劑量之西地那非（約15毫克/公斤/天）。在第28日，藉由右及左心臟導管插入術進行血液動力學分析。正如預期，經媒劑治療之大鼠顯示增加之右心室收縮壓（RVSP）、Fulton指數及肺血管阻力指數（PVR指數）（圖11A-C）。RVSP及PVR指數值在用J1-HE治療之大鼠中較低（圖11A及11C）。RVSP、Fulton指數及PVR指數值在用GMP-1-HE治療之大鼠中較低（圖11A-C）。組織學分析揭示，與經媒劑治療之大鼠相比，來自J1-HE及GMP-1-HE組之大鼠具有較少增厚的血管，其由定量證實（圖11D）。

【0231】 接著，在PAH之Sugen/缺氧模型中再次測試PSC衍生之HE。在此

等研究中，rnu/rnu大鼠經歷sugen/缺氧/常氧條件21天。在第0天給予大鼠單次劑量之Sugen，隨後在第1天以100萬、250萬或500萬個細胞靜脈內注射媒劑、J1-HE或GMP-1-HE。作為額外對照組，藉由經口管飼每天兩次給予另一組西地那非（50 mg/kg）。與經媒劑治療相比，以每注射250萬用J1-HE及GMP-1-HE治療之大鼠顯示減少之mPAP、RVSP及Fulton指數及提高之心肌功能，諸如心搏出量及心輸出量（圖12A-D）。此外，GMP-1-HE以劑量依賴型方式在肺血流動力學、RV重塑、心肌功能方面提高其功效（圖13A-D）。肺組織之組織學分析揭示在Sugen/缺氧模型中對照組與經J1-HE或GMP-1-HE治療之大鼠之間的差異（圖14A-C及圖15A-C）。與經媒劑治療相比，可能在經HE治療之動物中觀測到較少葉狀病灶（圖14A及15A）。與經媒劑治療之動物相比，亦減小經HE治療之動物中之肺血管壁厚度（圖14B及15B）。分類為經HE治療之組中之動物的肌肉及半肌肉的肺血管之百分比低於經媒劑治療之動物（圖14C及15C）。最後，與經媒劑治療之動物相比，經HE治療之肺具有較少免疫細胞浸潤（資料未展示）。

【0232】 來自Sugen/缺氧模型之經HE及媒劑治療之大鼠肺的肺之全轉錄組分析支持表明HE治療減弱病理性血管重塑的生理資料。在第21天收集來自大鼠肺之RNA，且進行不同的基因表現分析。藉由細胞治療使基因之路徑分析下調≥1.25倍指示，與平滑肌細胞發育、免疫細胞系統浸潤及發炎以及其他相關之基因減少。相反，藉由細胞治療使基因上調≥1.25倍與有利的代謝狀態相關，亦即有助於氧化磷酸化，其擾動與PAH疾病病況相關。綜合而言，此等資料表明HE以每次注射250萬至500萬之劑量範圍藉由減少血管阻力、血管重塑及心肥大保護PAH模型中之大鼠。

實施例11：HE恢復肺中之微小血管

【0233】 內皮祖細胞據報導保持經MCT處理之肺中之微小血管（Zhao等

人Cir. Res. 96:442-450 (2005))。因此，微CT掃描在來自用Nx對照組、媒劑、西地那非及100萬及500萬GMP1-HE細胞治療之SuHx模型之肺上進行。微CT掃描揭示正常肺中微血管灌注之遠端小動脈床及均質圖案之平均填充（圖16A）。相比之下，用媒劑治療之SuHx肺顯示變窄的遠端小動脈床及微血管阻塞（圖16B）。用500萬HE細胞（圖16D）但不用100萬HE細胞（圖16C）進行之治療保持藉由顯影劑注射目測的微小血管。在用500萬HE細胞保持小動脈連續性及增強的微血管灌注下，肺微小血管之外觀存在顯著改善（圖16D）。西地那非之治療顯示微血管灌注之適度改善（圖16E）。

實施例12：HE含有具有治療活性之不同血管內皮部分

【0234】 HE之單細胞分析及上文所述之VECAD+ HE部分與HUVEC之間的相似性表明，此亞群可能為在PAH中為HE賦予其治療效果的活性組分。為了測試此，使用Sugen/缺氧模型之另一研究使用250萬「塊體」或未分選HE細胞及藉由針對VECAD+細胞進行磁性分選自「塊體」HE細胞純化的250萬VECAD+ HE細胞進行(圖17)。針對VECAD+細胞分選的部分顯示大部分亦表現CD31(圖17)。與經媒劑治療之動物相比，VECAD+ HE改善臨床量測：mPAP（圖18A）、RVSP（圖18B）、RV重塑（圖18C）及心輸出量（圖18D）。與經媒劑治療相比，亦維持肺血管具有較少葉狀病灶（圖18E）、減少之壁厚（圖18F）及減少之血管肌化（圖18G）。藉由遞送真實成熟內皮細胞HUVEC獲得類似結果。

【0235】 當針對FLK1/KDR表現分析J1-HE及GMP1-HE中之VECAD+/CD31+群體時，展示HE包含作為CD31+/VECAD+/FLK1+之群體（圖19）。

等效物

【0236】　熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常規實驗即可確定本文所描述之本發明特定實施方式的許多等效物。該等等效物意欲由以下申請專利範圍涵蓋。本申請案通篇所引用之所有參考文獻、專利及公開專利申請案之內容均以引用之方式併入本文中。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種治療罹患或疑似罹患血管疾病之個體之血管疾病的方法，其包含向該個體投予包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之造血內皮細胞(HE)的組成物。

【請求項2】如請求項1之方法，其中該血管疾病選自由以下者組成之群：冠狀動脈疾病（例如動脈硬化、動脈粥樣硬化、及動脈、小動脈及微血管之其他疾病或損傷或相關不適）、心肌梗塞（例如急性心肌梗塞）、組織性心肌梗塞（organizing myocardial infarct）、缺血性心臟病、心律不整、左心室擴張、栓塞、心臟衰竭、鬱血性心臟衰竭、心內膜下纖維化、左心室肥大或右心室肥大、心肌炎、慢性冠狀動脈缺血、擴張型心肌病變、再狹窄、心律不整、心絞痛、高血壓（例如肺性高血壓、腎小球高血壓、門靜脈高血壓）、心肌肥大、包括嚴重肢體缺血之周邊動脈疾病、腦血管疾病、腎動脈狹窄、主動脈瘤、肺性心臟病、心臟性節律不整（cardiac dysrhythmias）、發炎性心臟病、先天性心臟病、風濕性心臟病、糖尿病性血管疾病、內皮肺損傷疾病（例如急性肺損傷（ALI）及急性呼吸窘迫症候群（ARDS））。

【請求項3】如請求項1之方法，其中該血管疾病為肺性高血壓。

【請求項4】如請求項1之方法，其中該血管疾病為肺動脈性高血壓。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之方法，其中該個體之平均肺（動脈）壓降低。

【請求項6】一種增大罹患或疑似罹患血管疾病之個體的肺動脈中之血流的方法，其包含向該個體投予包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE的組成物。

【請求項7】如請求項6之方法，其中該個體患有肺性高血壓。

【請求項8】如請求項6之方法，其中該個體患有肺動脈性高血壓。

【請求項9】一種降低罹患或疑似罹患血管疾病之個體之血壓的方法，其包

含向該個體投予包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE的組成物。

【請求項10】如請求項9之方法，其中該個體患有肺性高血壓。

【請求項11】如請求項9之方法，其中該個體患有肺動脈性高血壓。

【請求項12】如請求項9之方法，其中該血壓為舒張壓。

【請求項13】如請求項9之方法，其中該血壓為收縮壓。

【請求項14】如請求項9之方法，其中該血壓為平均肺（動脈）壓。

【請求項15】如請求項9至14中任一項之方法，其中該個體之血壓降低至少20%。

【請求項16】如請求項1至15中任一項之方法，其中該等HE對於至少一種選自由以下者組成之群的微RNA（miRNA）呈陽性：miRNA-126、miRNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、miRNA-335、hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p。

【請求項17】如請求項16之方法，其中該等HE對於(i)miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335及/或(ii)hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。

【請求項18】如請求項16之方法，其中該等HE對於(i)miRNA-126、miRNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335及/或(ii) hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。

【請求項19】如請求項16之方法，其中該等HE對於miRNA-214呈陽性。

【請求項20】如請求項1至19中任一項之方法，其中該等HE對於至少一種選自由以下者組成之群的miRNA呈陰性：miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p。

【請求項21】如請求項20之方法，其中該等HE對於miRNA-223及miRNA-142-3p呈陰性。

【請求項22】如請求項20之方法，其中該等HE對於miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p呈陰性。

【請求項23】如請求項1至22中任一項之方法，其中該等HE表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞表面標記：CD31/PECAM1、CD309/KDR、CD144、CD34、CXCR4、CD146、Tie2、CD140b、CD90、CD271、及CD105。

【請求項24】如請求項23之方法，其中該等HE表現CD146、CXCR4、CD309/KDR、CD90、及CD271。

【請求項25】如請求項23之方法，其中該等HE表現CD146。

【請求項26】如請求項23之方法，其中該等HE表現CD144 (VECAD)。

【請求項27】如請求項26之方法，其中HE表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞標記：CD31、CD309/KDR (FLK-1)、PLVAP、GJA4、ESAM、EGFL7、KDR/VEGFR2、及ESAM。

【請求項28】如請求項26或27之方法，其中該等HE進一步表現至少一種選自由SOX9、PDGFRA、及EGFRA組成之群的細胞標記。

【請求項29】如請求項26至28中任一項之方法，其中該等HE進一步表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞標記：KDR/VEGFR2、NOTCH4、膠原蛋白I、及膠原蛋白IV。

【請求項30】如請求項23之方法，其中該等HE表現CD31/PECAM1、CD309/KDR、CD144、CD34、及CD105。

【請求項31】如請求項1至29中任一項之方法，其中該等HE呈現至少一種選自由CD34、CXCR7、CD43、及CD45組成之群的細胞表面標記之受限偵測或無偵測。

【請求項32】如請求項1至31中任一項之方法，其中該等HE呈現CXCR7、CD43、及CD45之受限偵測或無偵測。

【請求項33】如請求項1至31中任一項之方法，其中該等HE呈現CD43及CD45之受限偵測或無偵測。

【請求項34】如請求項1至33中任一項之方法，其中該等HE為CD43(-)、CD45(-)、及CD146(+)。

【請求項35】如請求項1至34中任一項之方法，其中該等多能幹細胞為胚胎幹細胞。

【請求項36】如請求項1至34中任一項之方法，其中該等多能幹細胞為誘導性多能幹細胞。

【請求項37】如請求項1至36中任一項之方法，其中該等HE藉由在黏附條件下在不存在甲基纖維素的情況下在分化培養基中培養該等多能幹細胞而獲得。

【請求項38】如請求項1至37中任一項之方法，其中該等HE藉由在無類胚體（embryoid body）形成的情況下試管內分化多能幹細胞而獲得。

【請求項39】如請求項1至38中任一項之方法，其中該個體為人類。

【請求項40】如請求項1至39中任一項之方法，其中該等多能幹細胞為人類多能幹細胞。

【請求項41】如請求項1至40中任一項之方法，其中該等HE為人類HE。

【請求項42】一種包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE的組成物，其中該等HE為CD43(-)、CD45(-)、及CD146(+)。

【請求項43】一種包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE的組成物，其中該等HE對於至少一種選自由以下者組成之群的微RNA（miRNA）呈陽性：miRNA-126、mi-RNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、miRNA-335、hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p。

【請求項44】如請求項43之組成物，其中該等HE對於（i）miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335及/或（ii）hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-

miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。

【請求項45】如請求項43之組成物，其中該等HE對於（i）miRNA-126、miRNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335及/或（ii）hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。

【請求項46】如請求項43之組成物，其中該等HE對於miRNA-214呈陽性。

【請求項47】如請求項42至46中任一項之組成物，其中該等HE對於至少一種選自由以下者組成之群的miRNA呈陰性：miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p。

【請求項48】如請求項47之組成物，其中該等HE對於miRNA-223及miRNA-142-3p呈陰性。

【請求項49】如請求項47之組成物，其中該等HE對於miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p呈陰性。

【請求項50】如請求項43至49中任一項之組成物，其中該等HE為CD43(-)、CD45(-)、及CD146(+)。

【請求項51】一種包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE的組成物，其中該等HE表現CD144 (VECAD)。

【請求項52】如請求項51之組成物，其中HE進一步表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞標記：CD31、CD309/KDR (FLK-1)、PLVAP、GJA4、ESAM、EGFL7、KDR/VEGFR2、及ESAM。

【請求項53】如請求項51或52之組成物，其中該等HE進一步表現至少一種選自由SOX9、PDGFRA、及EGFRA組成之群的細胞標記。

【請求項54】如請求項51至53中任一項之組成物，其中該等HE進一步表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞標記：KDR/VEGFR2、NOTCH4、膠原蛋白I、及膠原蛋白IV。

【請求項55】如請求項51至54中任一項之組成物，其中該組成物實質上缺乏CD144 (VECAD)陰性的HE細胞。

【請求項56】一種醫藥組成物，其包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE及醫藥學上可接受之載劑，其中該等HE為CD43(-)、CD45(-)、及CD146(+)。

【請求項57】一種醫藥組成物，其包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE及醫藥學上可接受之載劑，其中該等HE對於至少一種選自由以下者組成之群的微RNA（miRNA）呈陽性：miRNA-126、mi-RNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、miRNA-335、hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p。

【請求項58】如請求項57之醫藥組成物，其中該等HE對於（i）miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335及/或（ii）hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。

【請求項59】如請求項57之醫藥組成物，其中該等HE對於（i）miRNA-126、mi-RNA-24、miRNA-196-b、miRNA-214、miRNA-199a-3p、及miRNA-335及/或（ii）hsa-miR-11399、hsa-miR-196b-3p、hsa-miR-5690、及hsa-miR-7151-3p呈陽性。

【請求項60】如請求項57之醫藥組成物，其中該等HE對於miRNA-214呈陽性。

【請求項61】如請求項57至60中任一項之醫藥組成物，其中該等HE對於至少一種選自由以下者組成之群的miRNA呈陰性：miRNA-367、miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p。

【請求項62】如請求項61之醫藥組成物，其中該等HE對於miRNA-223及miRNA-142-3p呈陰性。

【請求項63】如請求項61之醫藥組成物，其中該等HE對於miRNA-367、

miRNA-302a、miRNA-302b、miRNA-302c、miRNA-223、及miRNA-142-3p呈陰性。

【請求項64】如請求項57至63中任一項之醫藥組成物，其中該等HE為CD43(-)、CD45(-)、及CD146(+)。

【請求項65】一種醫藥組成物，其包含藉由試管內分化多能幹細胞獲得之HE及醫藥學上可接受之載劑，其中該等HE表現CD144 (VECAD)、CD31、及CD309/KDR (FLK-1)。

【請求項66】如請求項65之醫藥組成物，其中HE進一步表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞標記：CD31、CD309/KDR (FLK-1)、PLVAP、GJA4、ESAM、EGFL7、KDR/VEGFR2、及ESAM。

【請求項67】如請求項65或66之醫藥組成物，其中該等HE進一步表現至少一種選自由SOX9、PDGFRA、及EGFRA組成之群的細胞標記。

【請求項68】如請求項65至67中任一項之醫藥組成物，其中該等HE進一步表現至少一種選自由以下者組成之群的細胞標記：KDR/VEGFR2、NOTCH4、膠原蛋白I、及膠原蛋白IV。

【請求項69】如請求項65至68中任一項之醫藥組成物，其中該組成物實質上缺乏CD144 (VECAD)陰性的HE細胞。

【請求項70】如請求項26至41中任一項之方法，其中該等HE表現（i）CD144 (VECAD)及（ii）CD31及/或CD309/KDR (FLK-1)。

【請求項71】如請求項26至41或70中任一項之方法，其中該等HE表現至少一種表22及表23中所列之基因。

【請求項72】如請求項51至54中任一項之組成物，其中該等HE表現（i）CD144 (VECAD)及（ii）CD31及/或CD309/KDR (FLK-1)。

【請求項73】如請求項51至54或72中任一項之組成物，其中該等HE表現至

少一種表22及表23中所列之基因。

【請求項74】如請求項65至69中任一項之醫藥組成物，其中該等HE表現（i）CD144 (VECAD)及（ii）CD31及/或CD309/KDR (FLK-1)。

【請求項75】如請求項65至69或74中任一項之醫藥組成物，其中該等HE表現至少一種表22及表23中所列之基因。

202122577

【發明圖式】

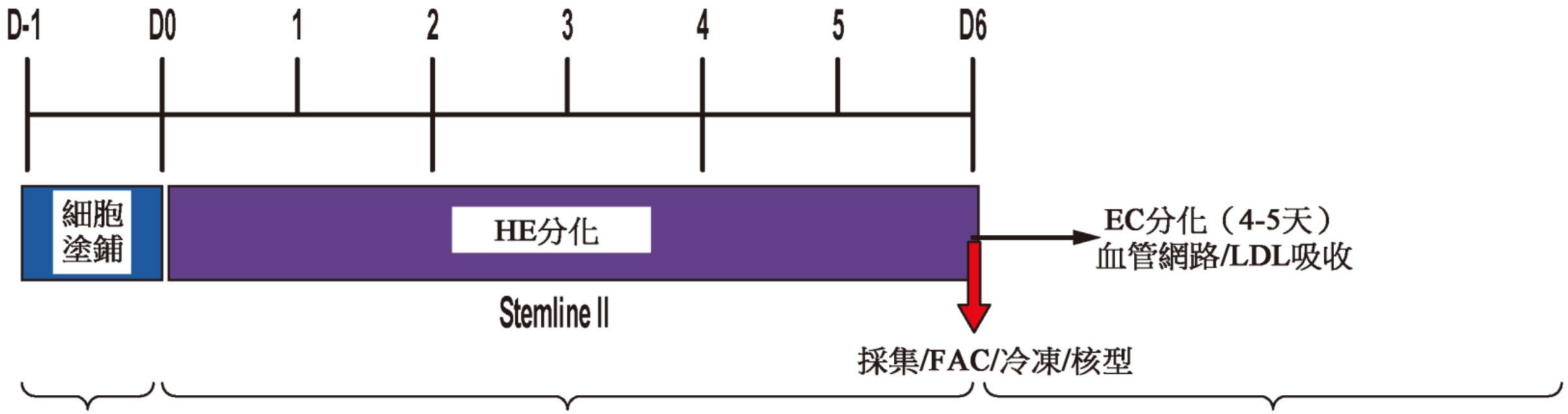


圖1

202122577

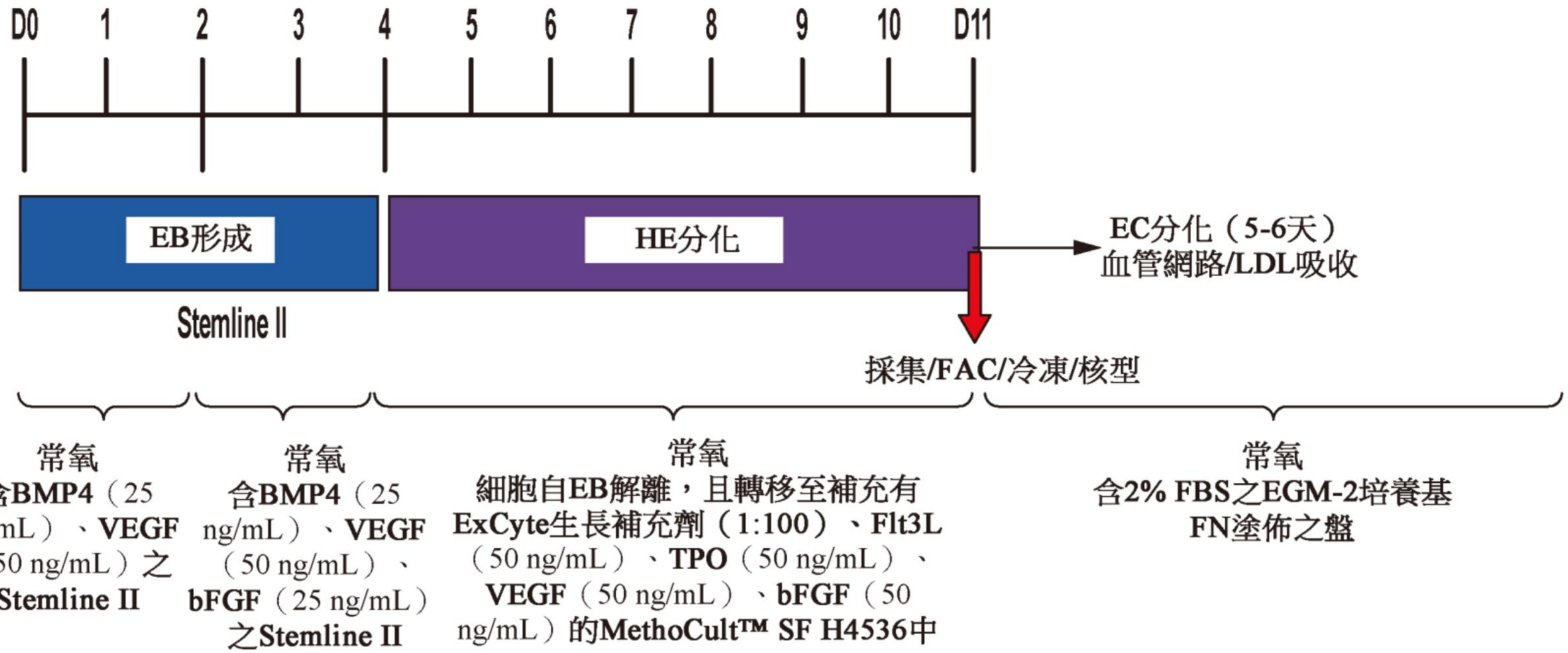


圖2

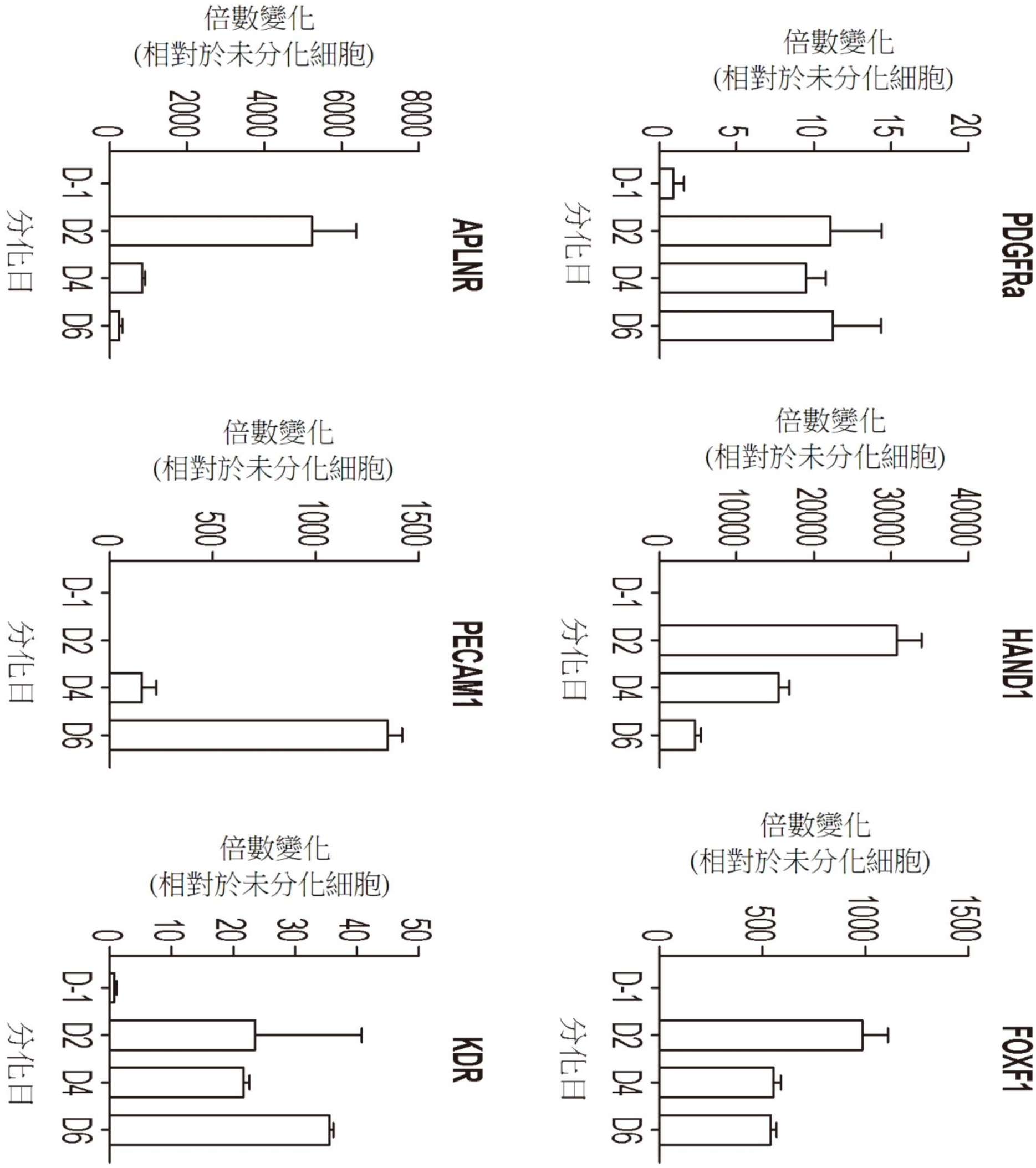

PDGFRa
倍數變化
(相對於未分化細胞)
0
5
10
15
20
D-1
D2
D4
D6
分化日
APLNR
倍數變化
(相對於未分化細胞)
0
5000
10000
15000
20000
D-1
D2
D4
D6
分化日
HAND1
倍數變化
(相對於未分化細胞)
0
10000
20000
30000
40000
D-1
D2
D4
D6
分化日
PECAM1
倍數變化
(相對於未分化細胞)
0
500
1000
1500
D-1
D2
D4
D6
分化日
FOXF1
倍數變化
(相對於未分化細胞)
0
500
1000
1500
D-1
D2
D4
D6
分化日
KDR
倍數變化
(相對於未分化細胞)
0
10
20
30
40
50
D-1
D2
D4
D6
分化日

圖3

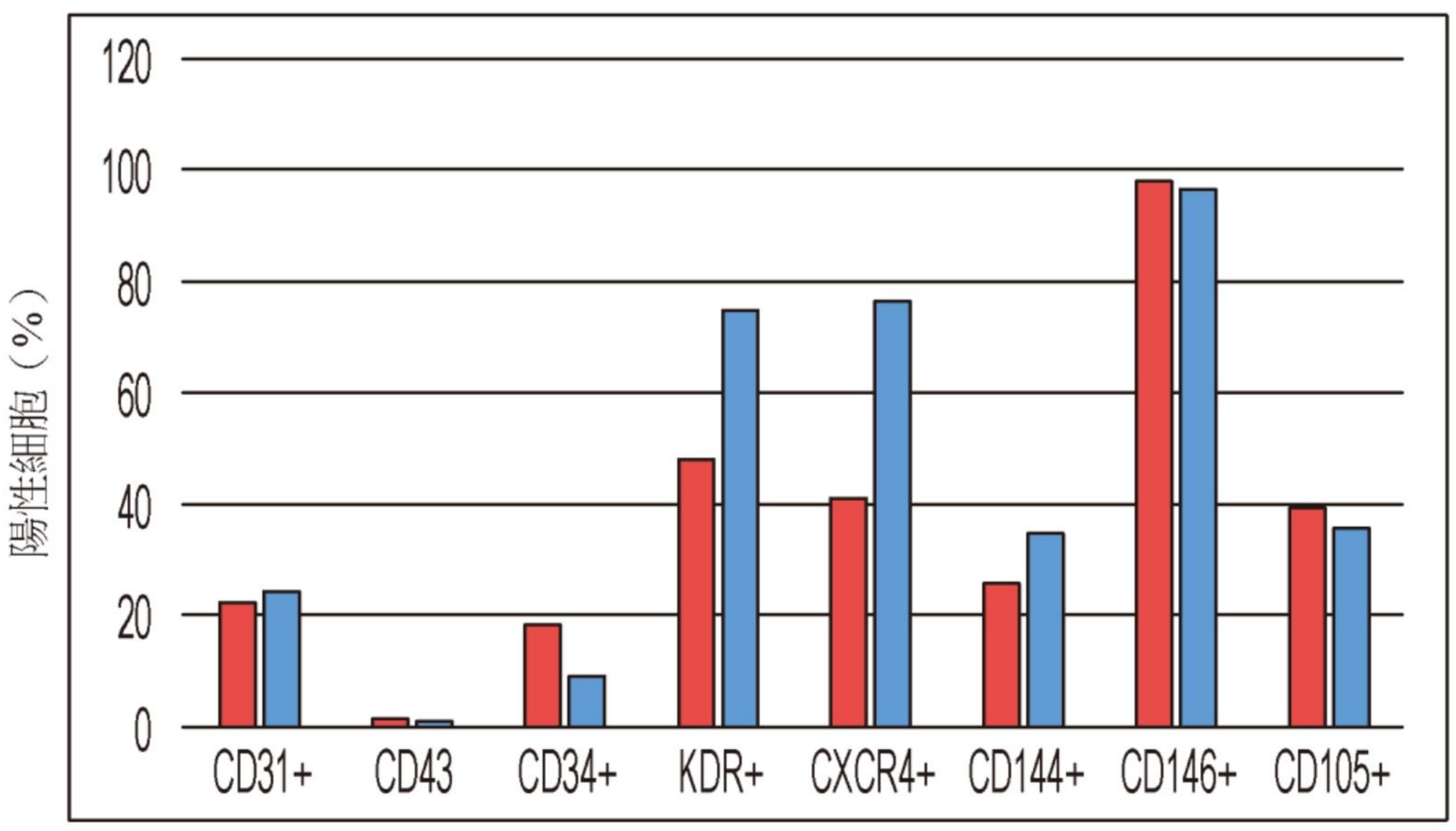

陽性細胞（%）
120
100
80
60
40
20
0
CD31+
CD43
CD34+
KDR+
CXCR4+
CD144+
CD146+
CD105+

圖4A

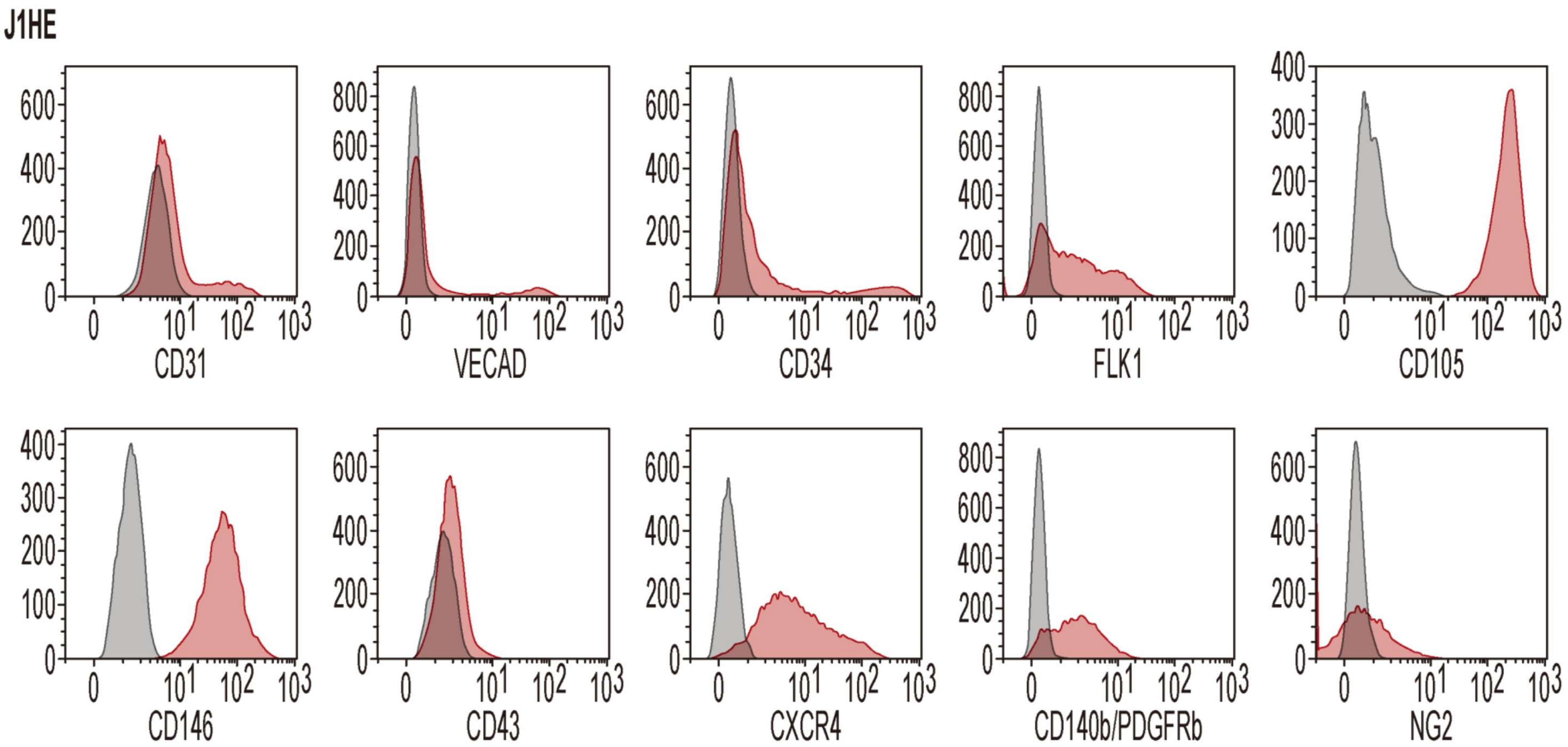

J1HE
CD31
VECAD
CD34
FLK1
CD105
CD146
CD43
CXCR4
CD140b/PDGFRb
NG2

圖4B

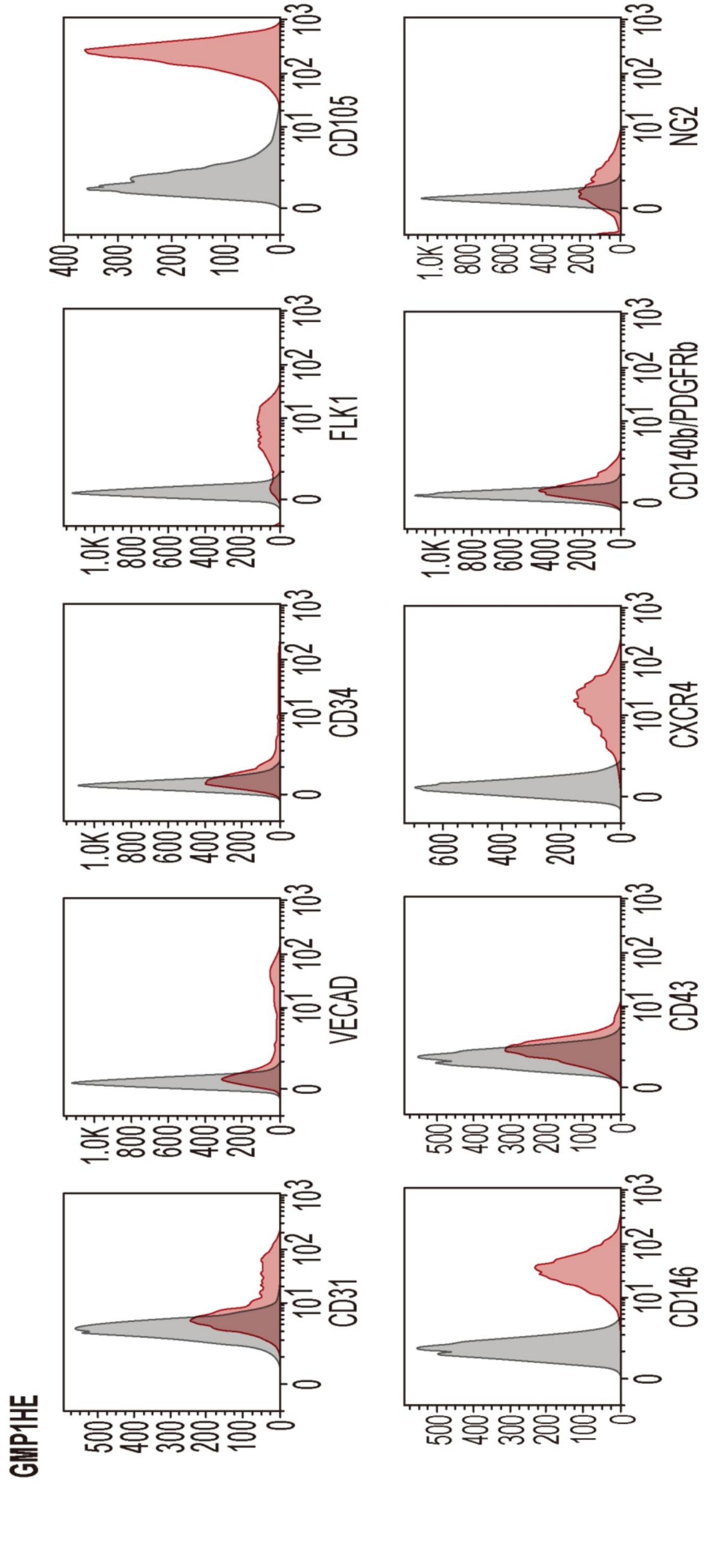

CD105
NG2
FLK1
CD140b/PDGFRb
CD34
CXCR4
VECAD
CD43
CD31
CD146
GMP1HE

圖4B（續）

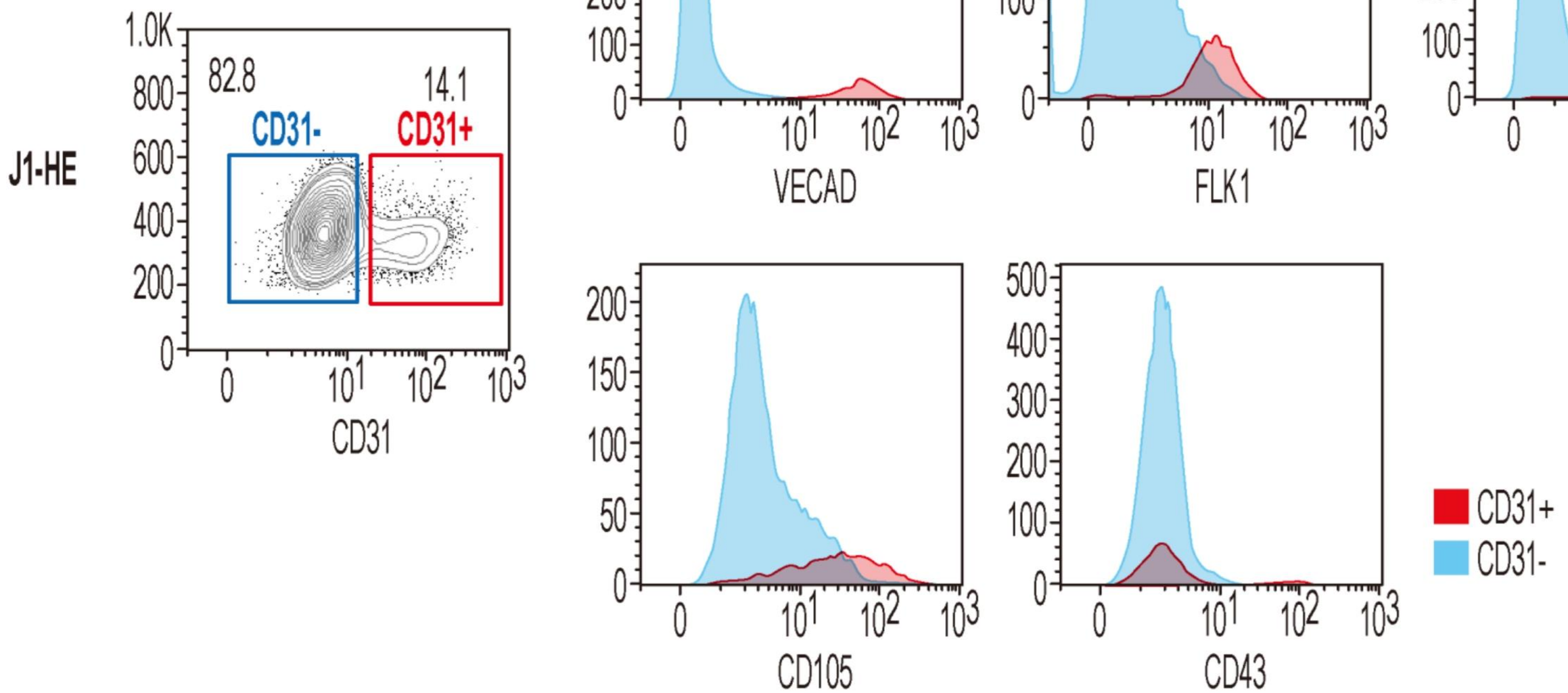

J1-HE
1.0K
800
600
400
200
0
82.8
14.1
CD31-
CD31+
0
10^1
10^2
10^3
CD31
500
400
300
200
100
0
VECAD
300
200
100
FLK1
CD34
150
50
CD105
CD43
CD31+
CD31-

圖5

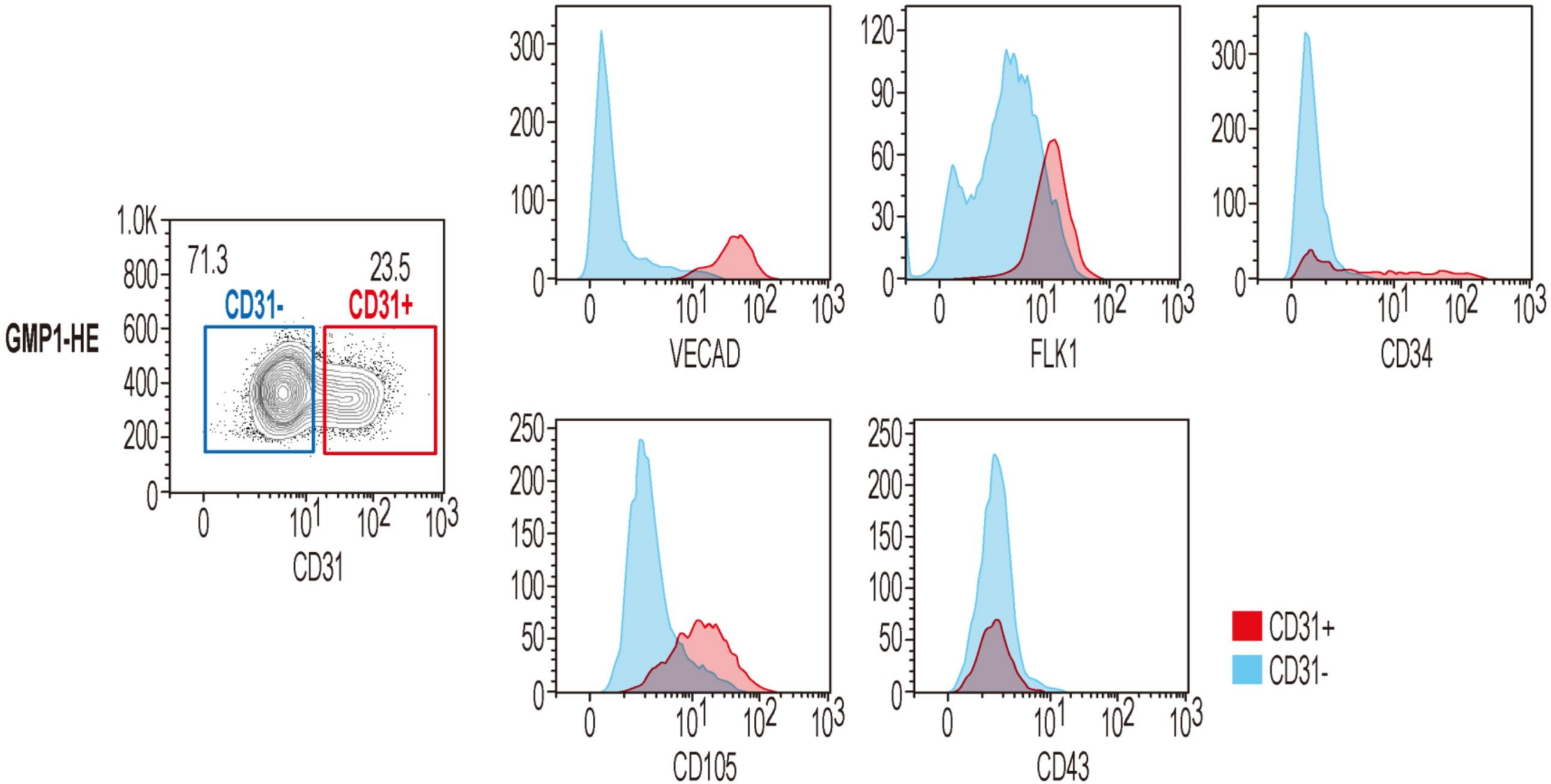

GMP1-HE
1.0K
800
600
400
200
0
71.3
23.5
CD31-
CD31+
0
10^1
10^2
10^3
CD31
300
200
100
0
VECAD
120
90
60
30
0
FLK1
300
200
100
0
CD34
250
200
150
100
50
0
CD105
250
200
150
100
50
0
CD43
CD31+
CD31-

圖5（續）

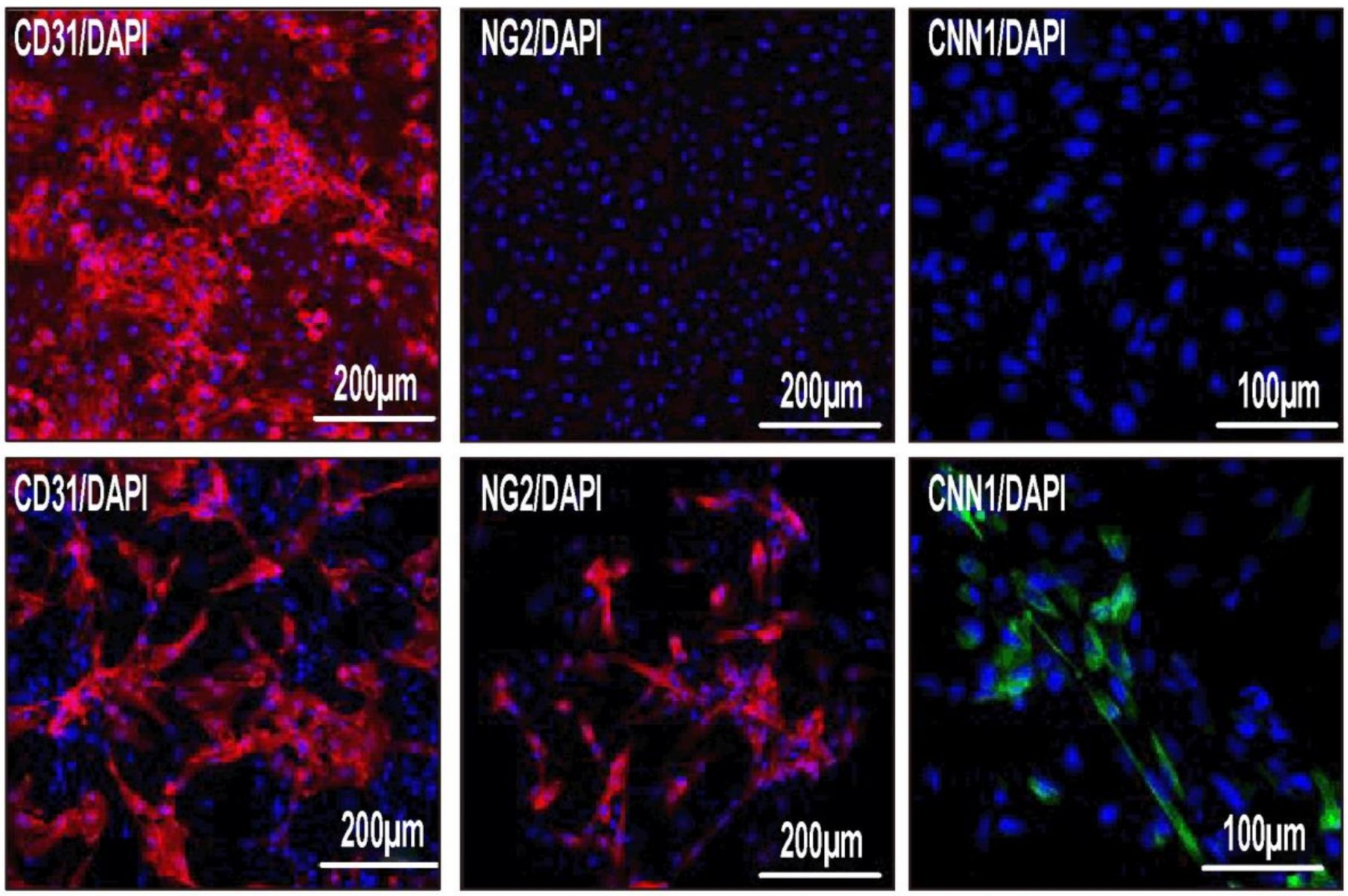

CD31/DAPI
200μm
NG2/DAPI
200μm
CNN1/DAPI
100μm
CD31/DAPI
200μm
NG2/DAPI
200μm
CNN1/DAPI
100μm

圖6

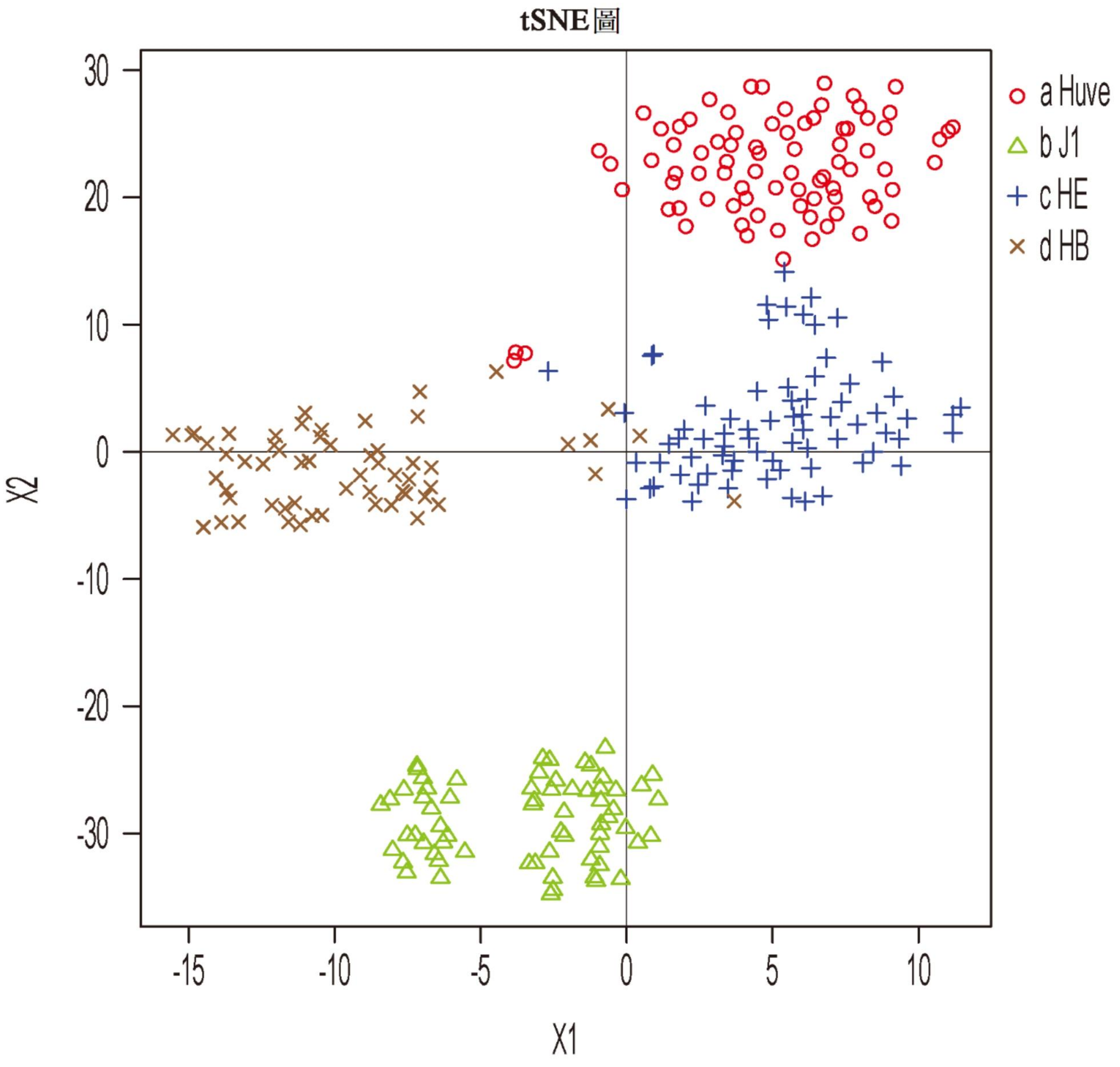


圖7

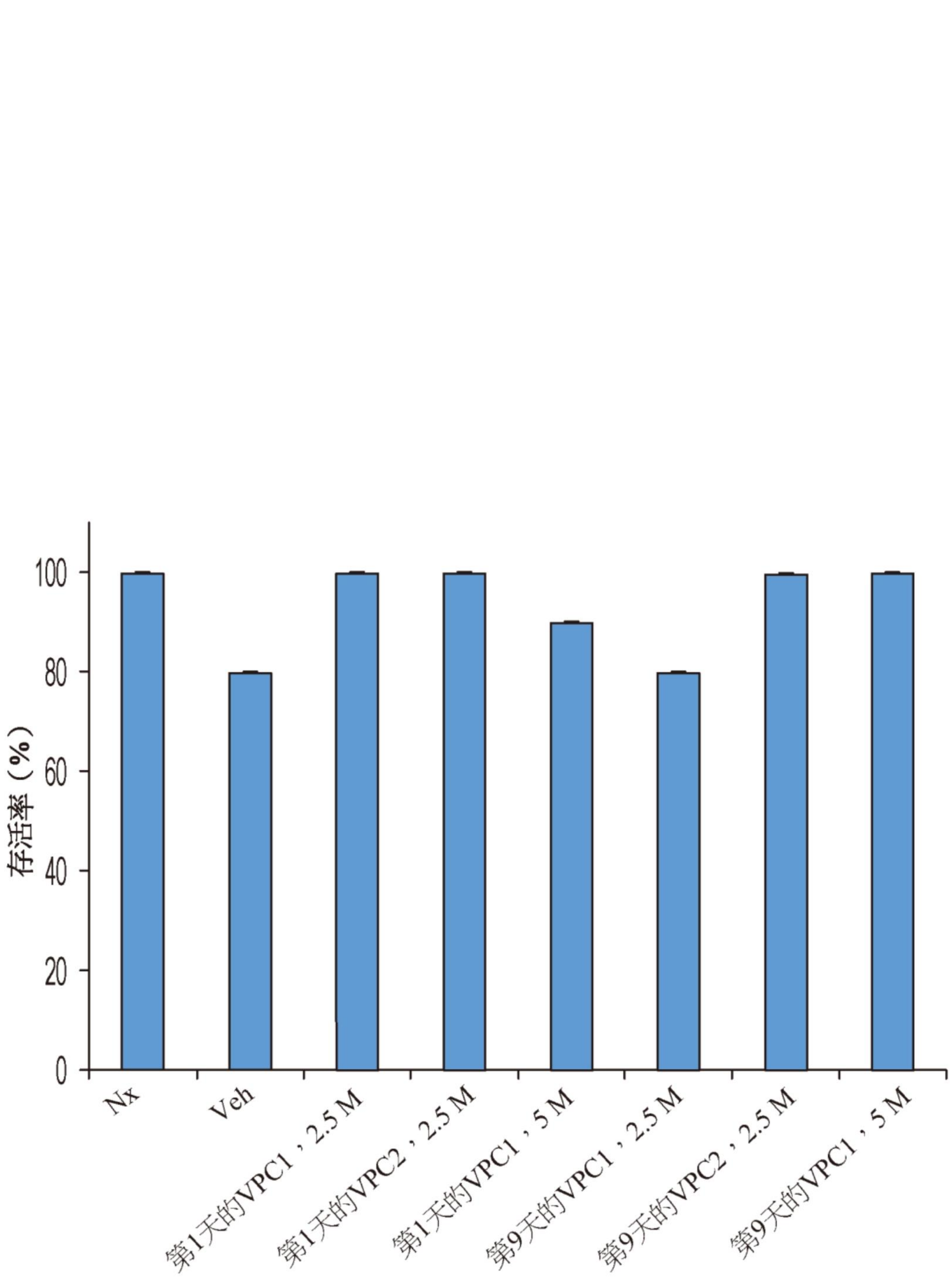

100
80
60
40
20
0
存活率（%）
Nx
Veh
第1天的VPC1，2.5 M
第1天的VPC2，2.5 M
第1天的VPC1，5 M
第9天的VPC1，2.5 M
第9天的VPC2，2.5 M
第9天的VPC1，5 M

圖8

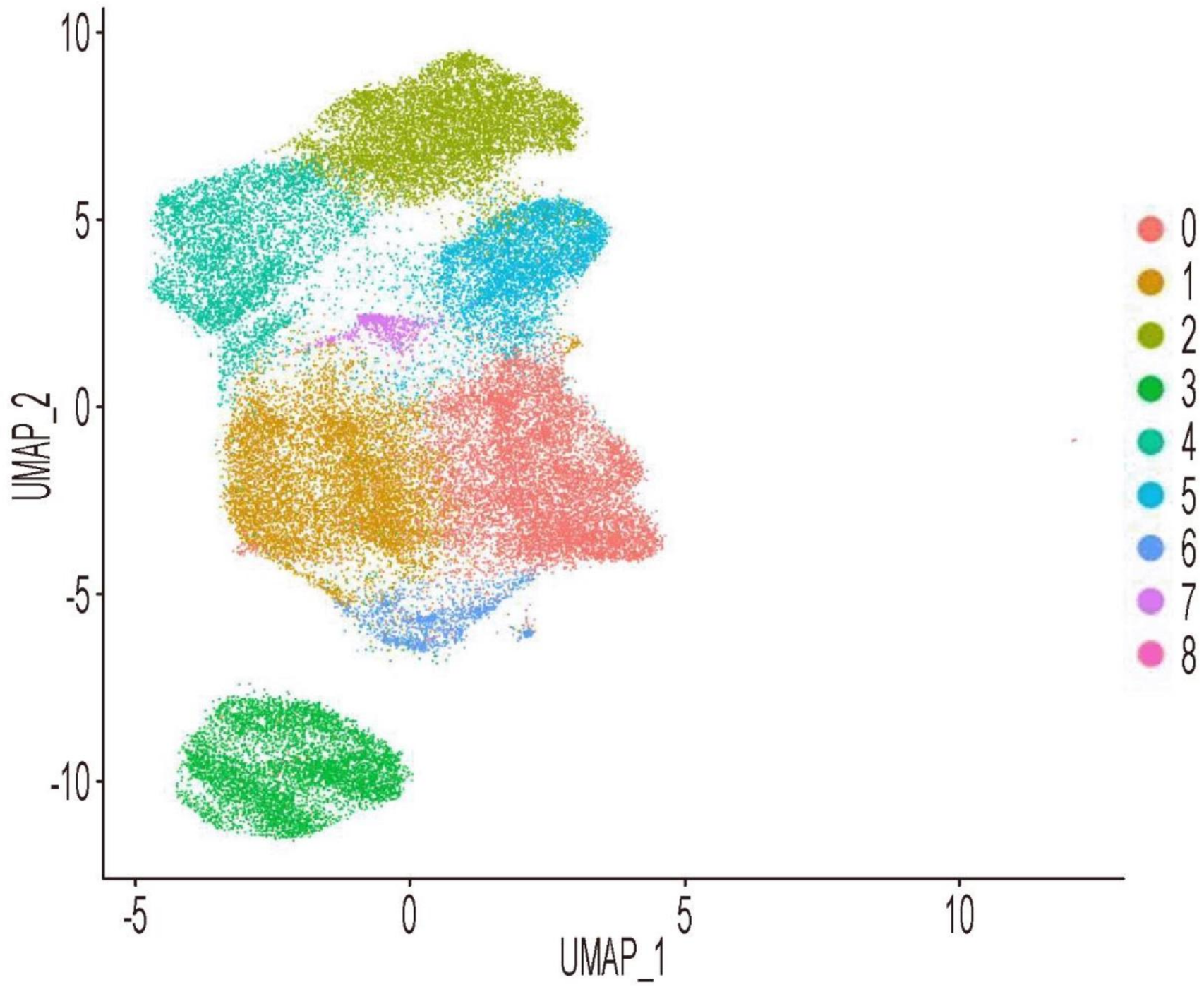

10
5
0
-5
-10
UMAP_2
-5
0
5
10
UMAP_1
0
1
2
3
4
5
6
7
8

圖9A

100
75
50
25
0
百分比
0
1
2
3
4
5
6
7
8
團簇數
樣本組
HUVEC
IPSC
VPC餵養層活性

圖9B

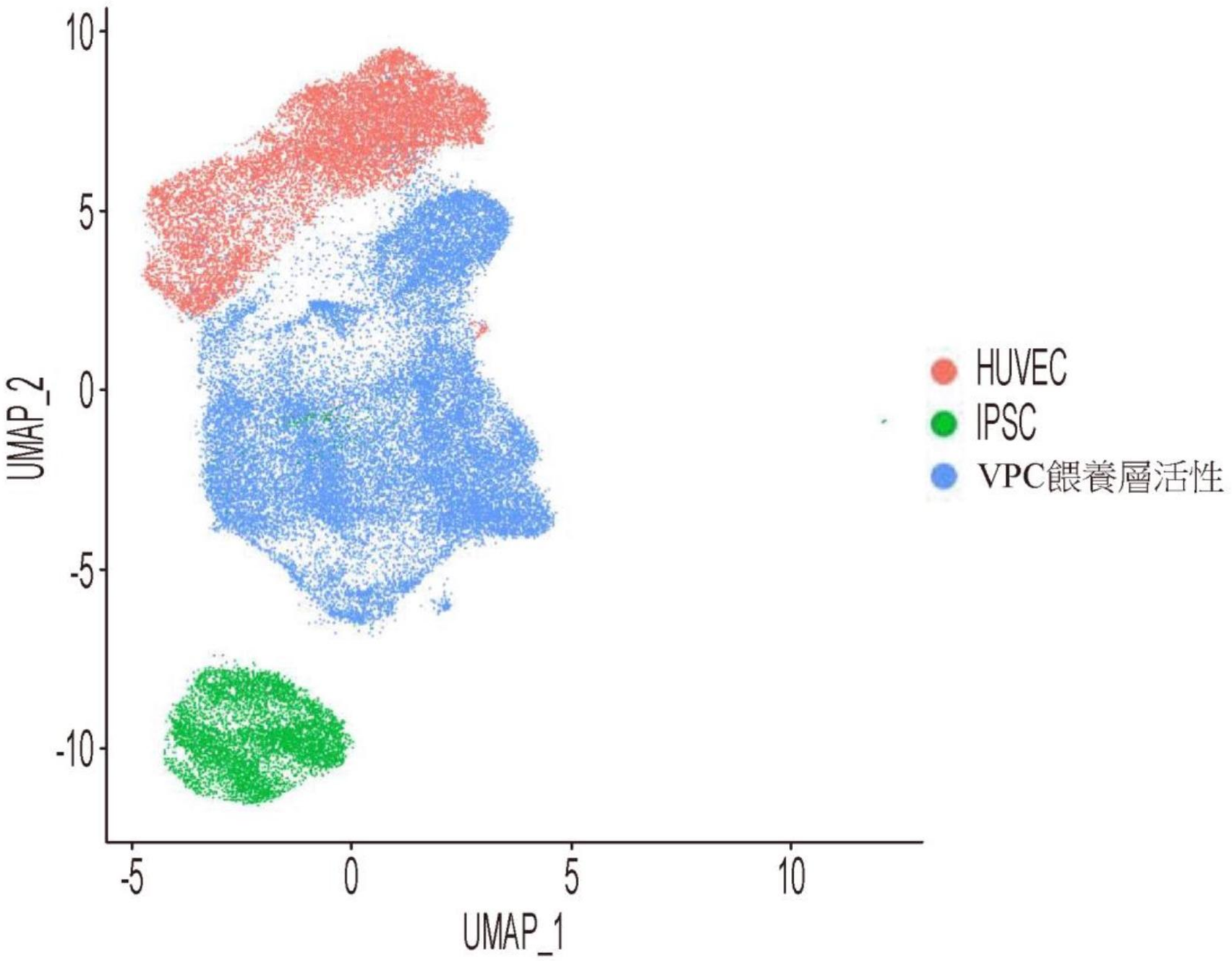


圖9C

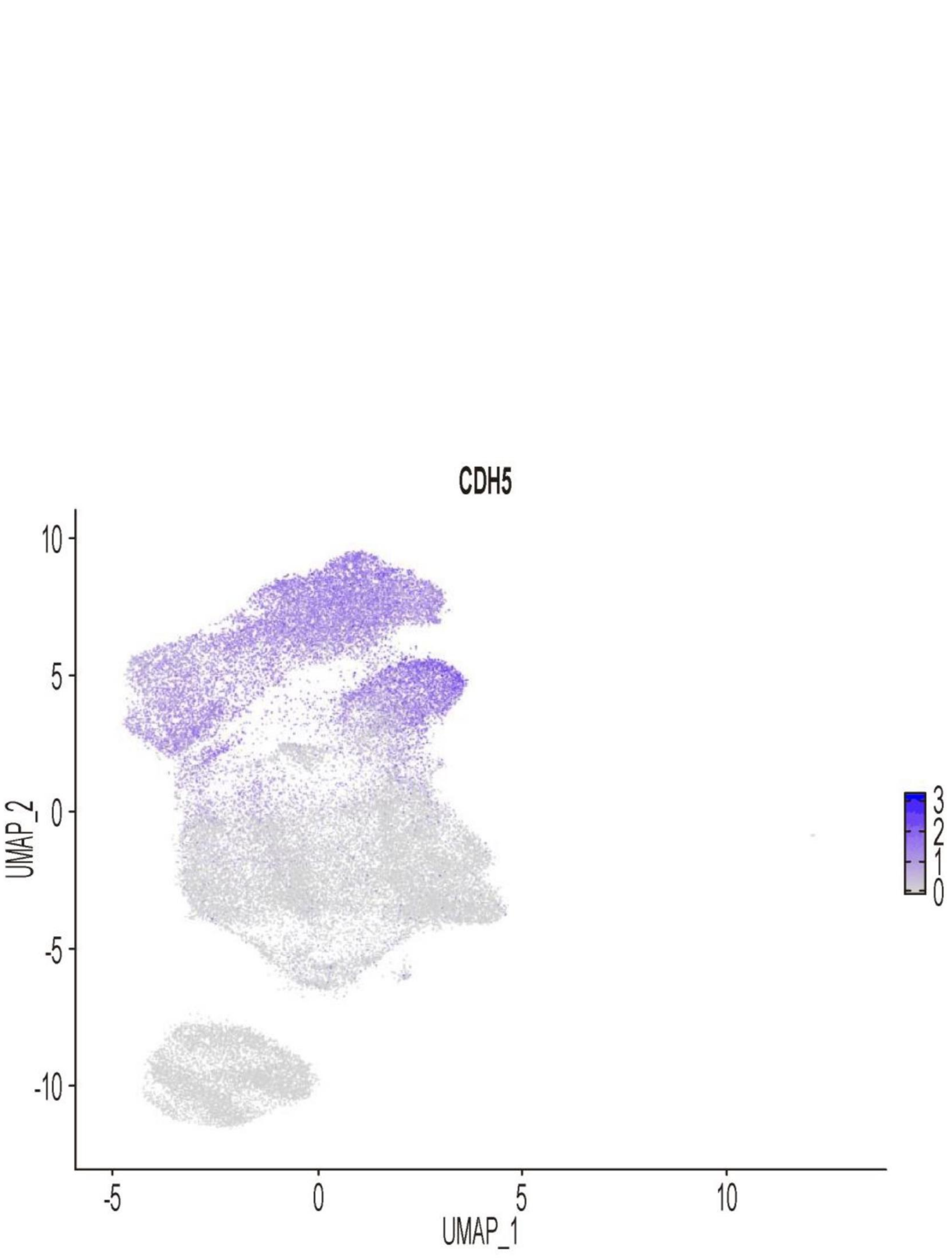


圖10

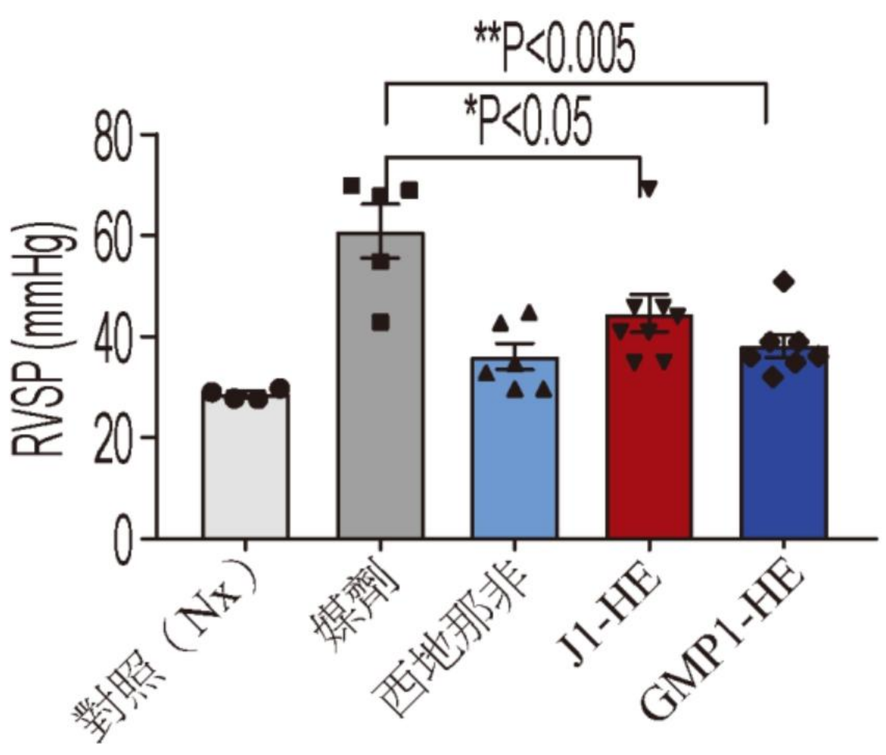


圖11A

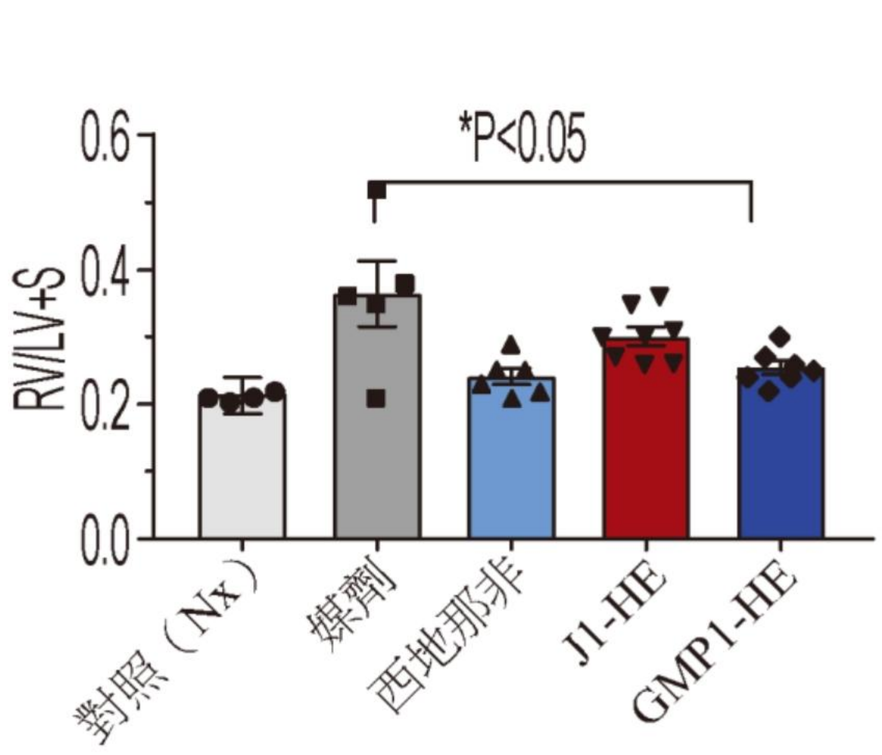


圖11B

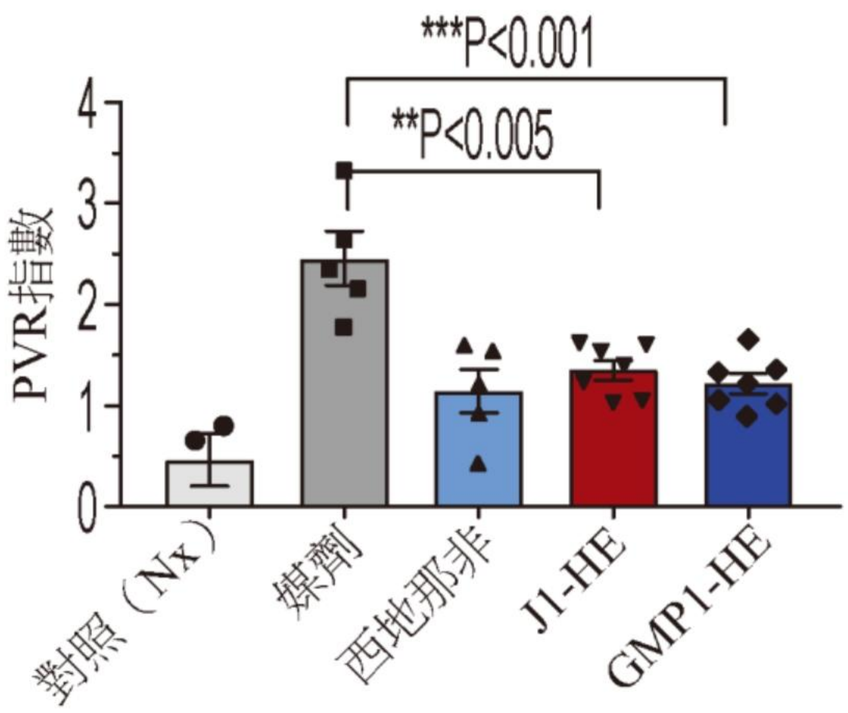


圖11C

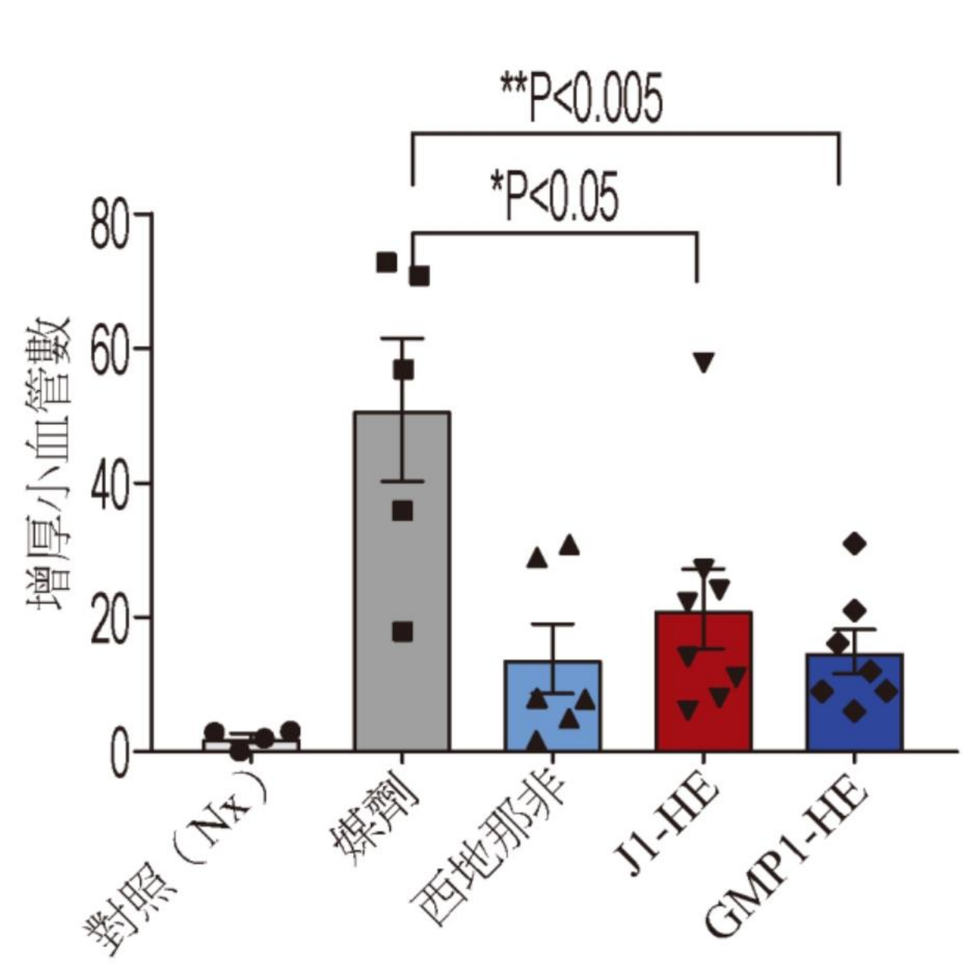


圖11D

202122577

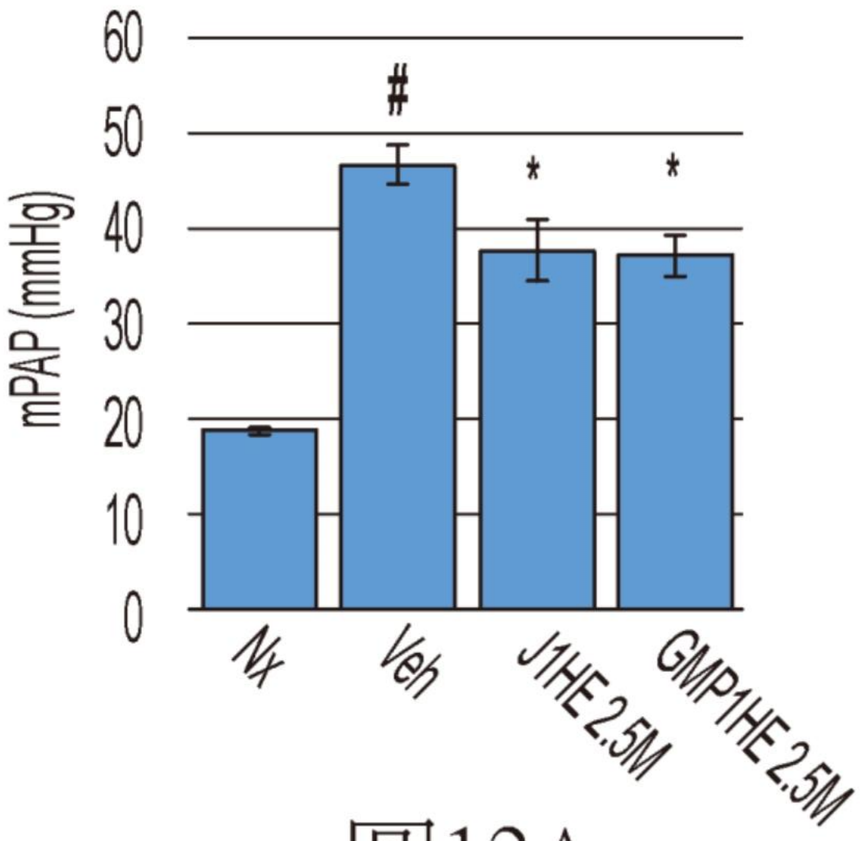


圖12A

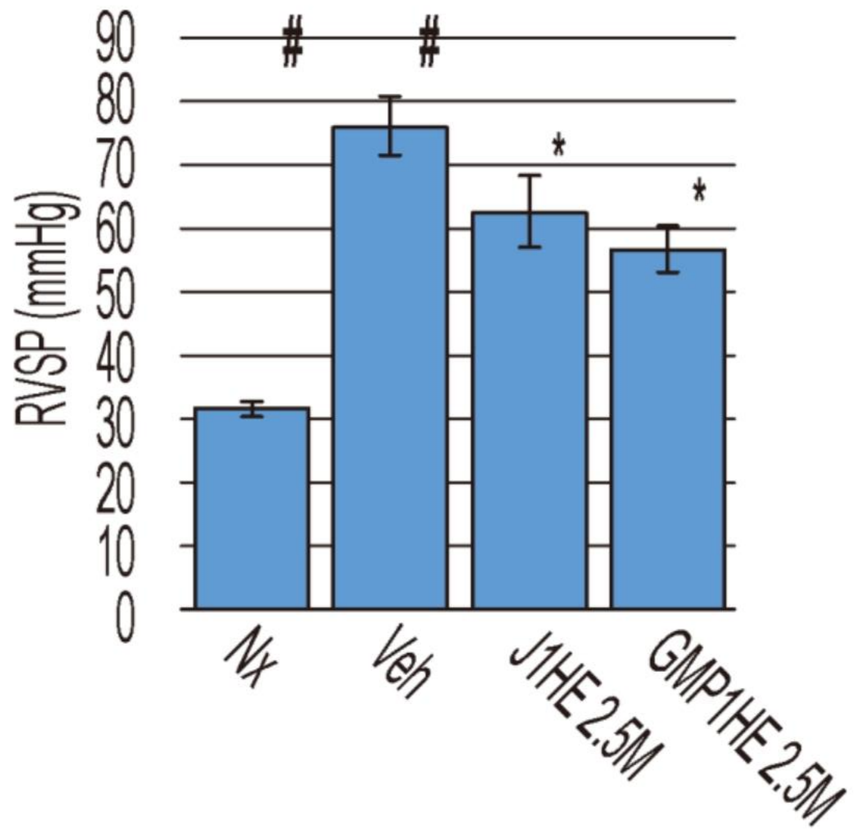


圖12B

#：與Nx相比p<0.05
*：與媒劑相比p<0.05

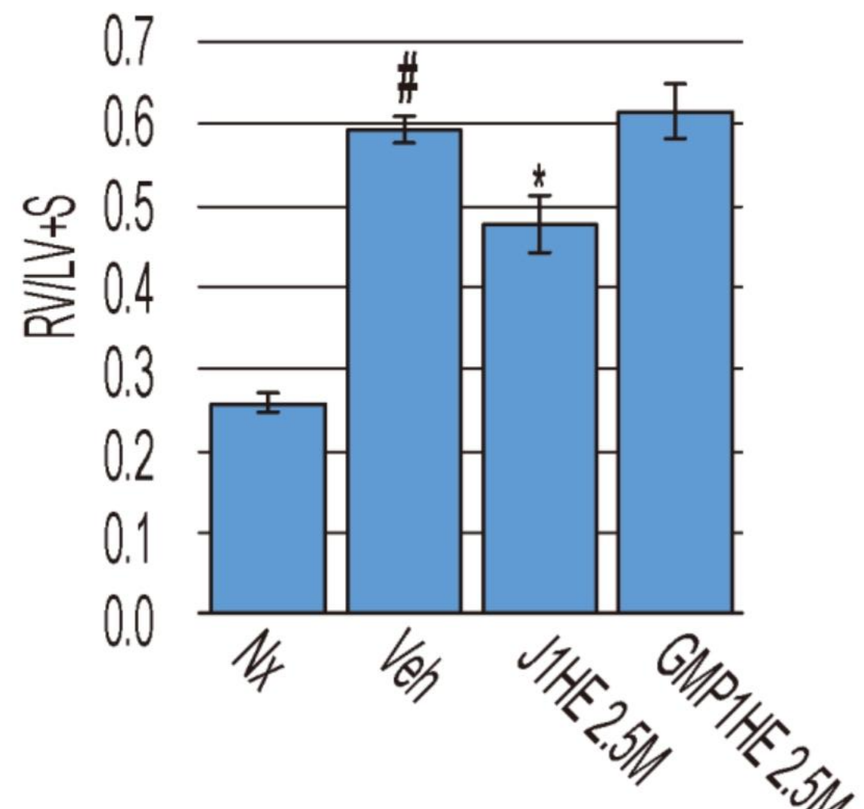


圖12C

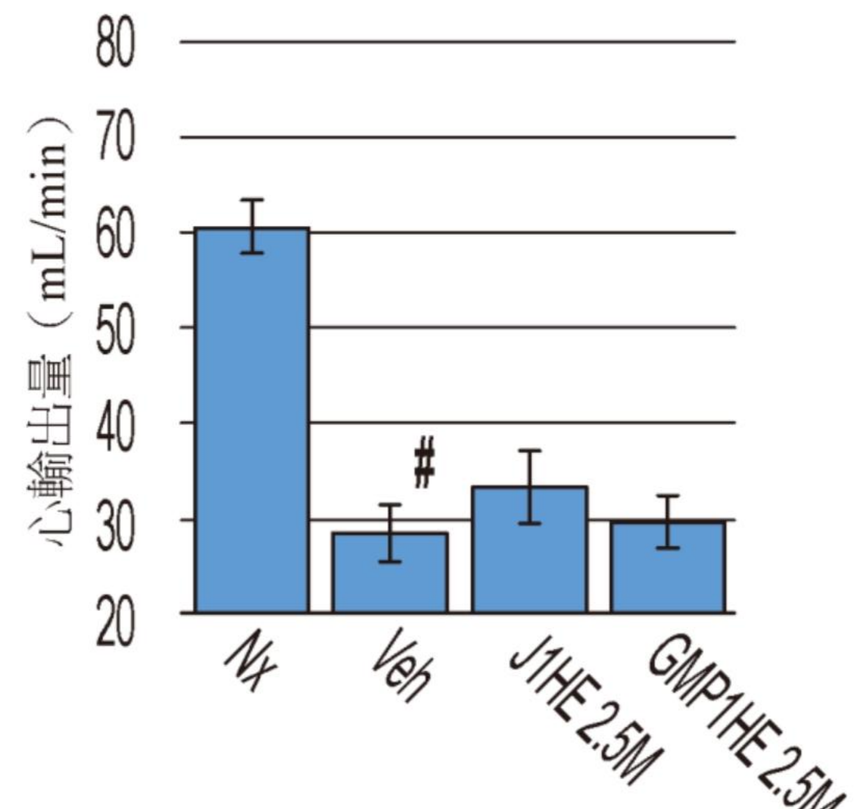


圖12D

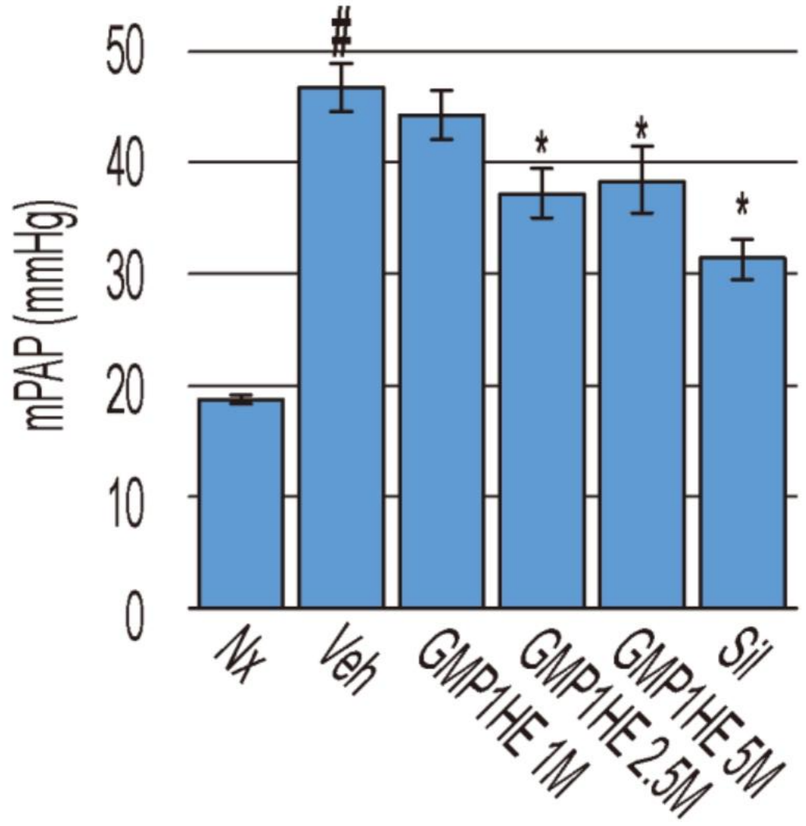


圖13A

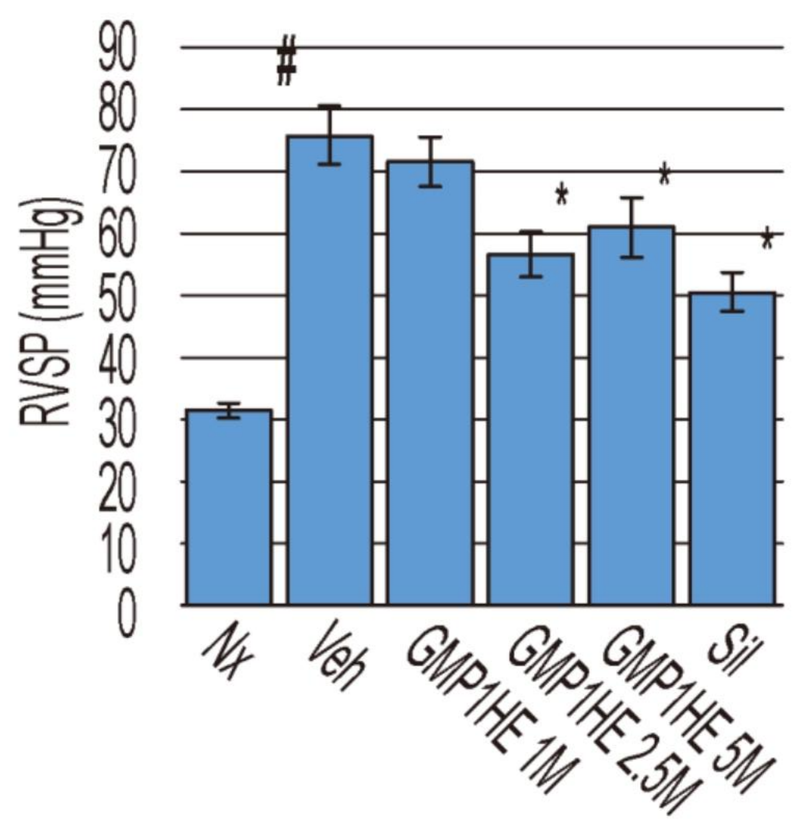


圖13B

#：與Nx相比p<0.05
*：與媒劑相比p<0.05

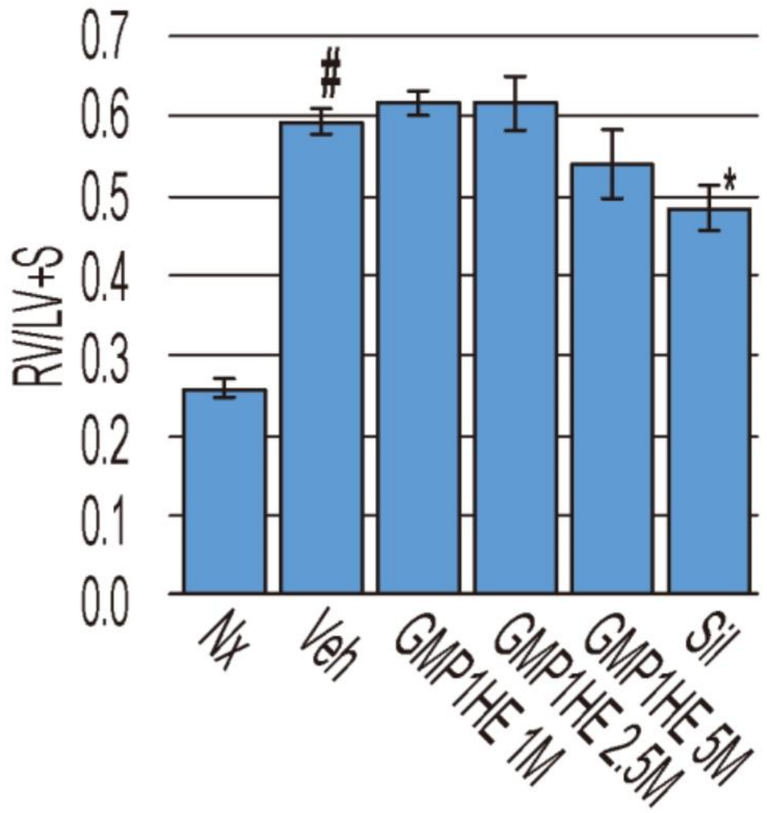


圖13C

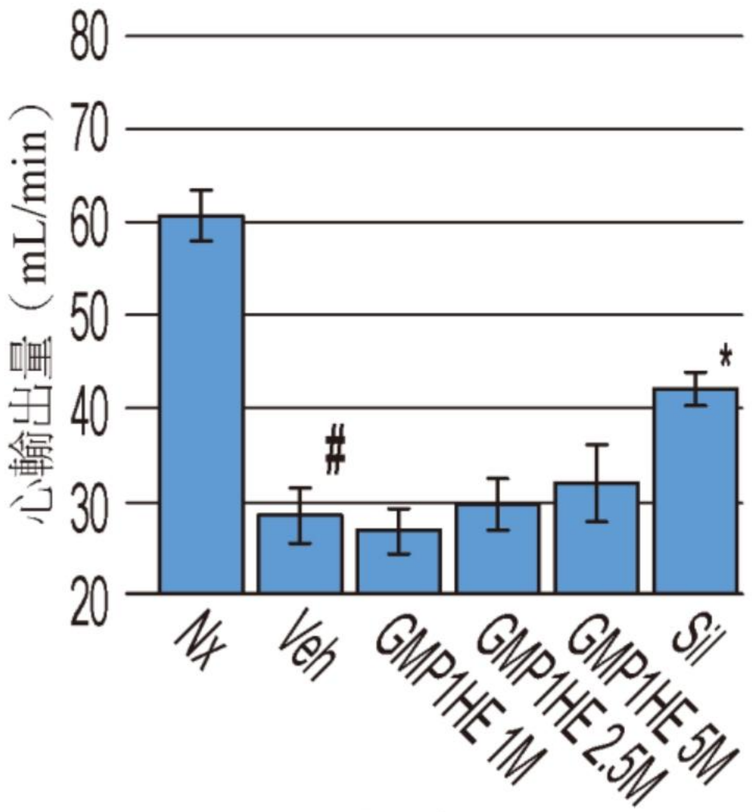


圖13D

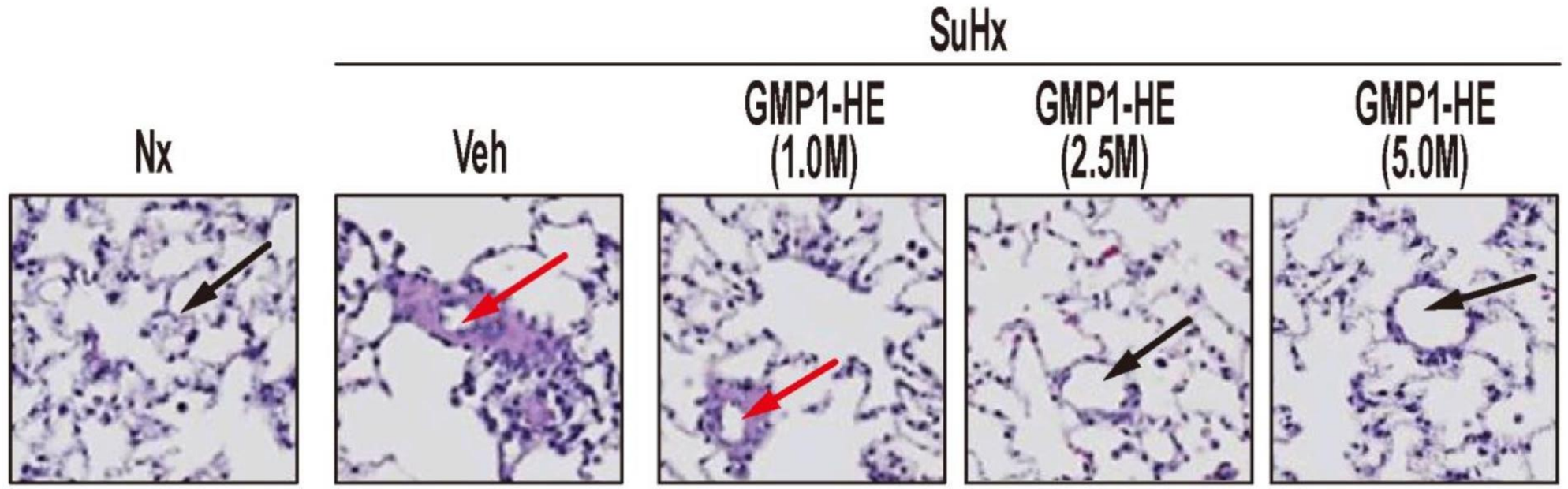


圖14A

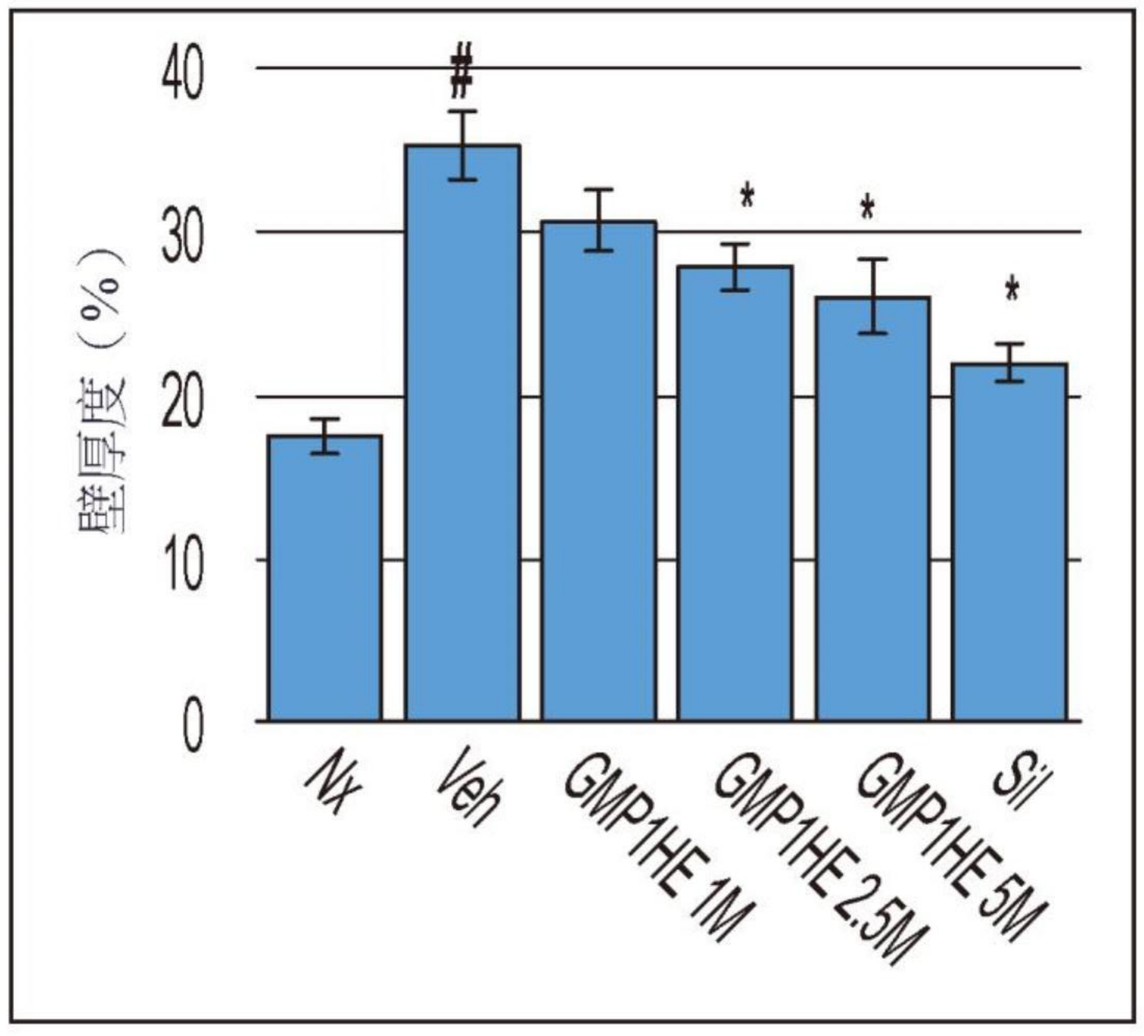


圖14B

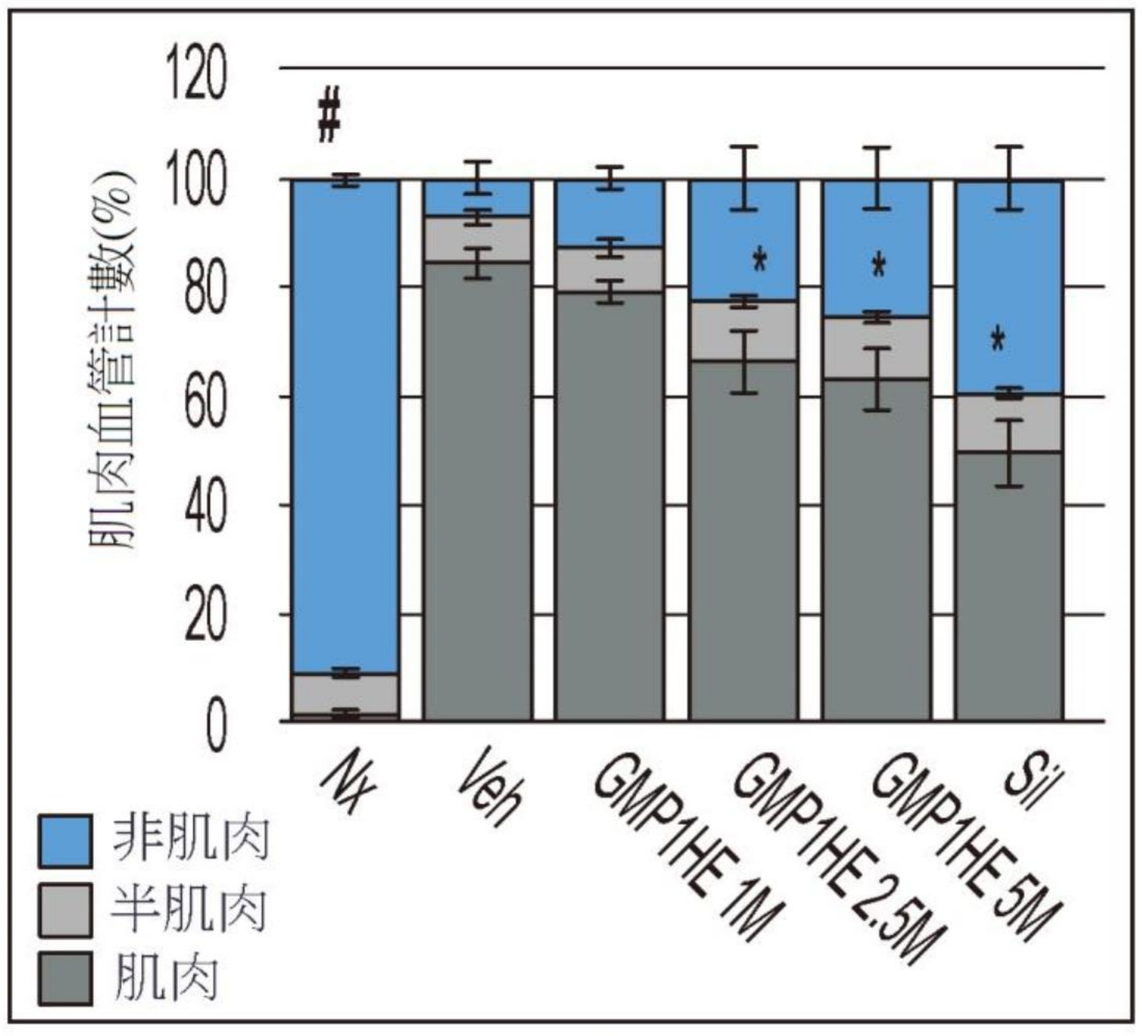


圖14C

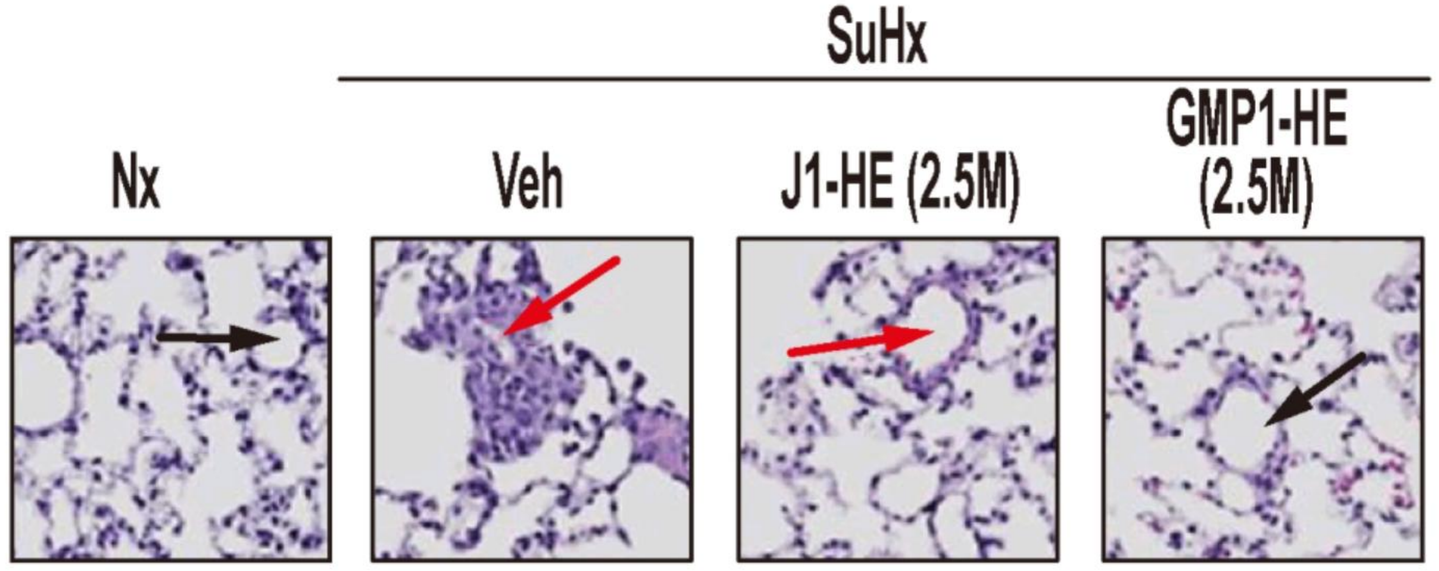


圖15A

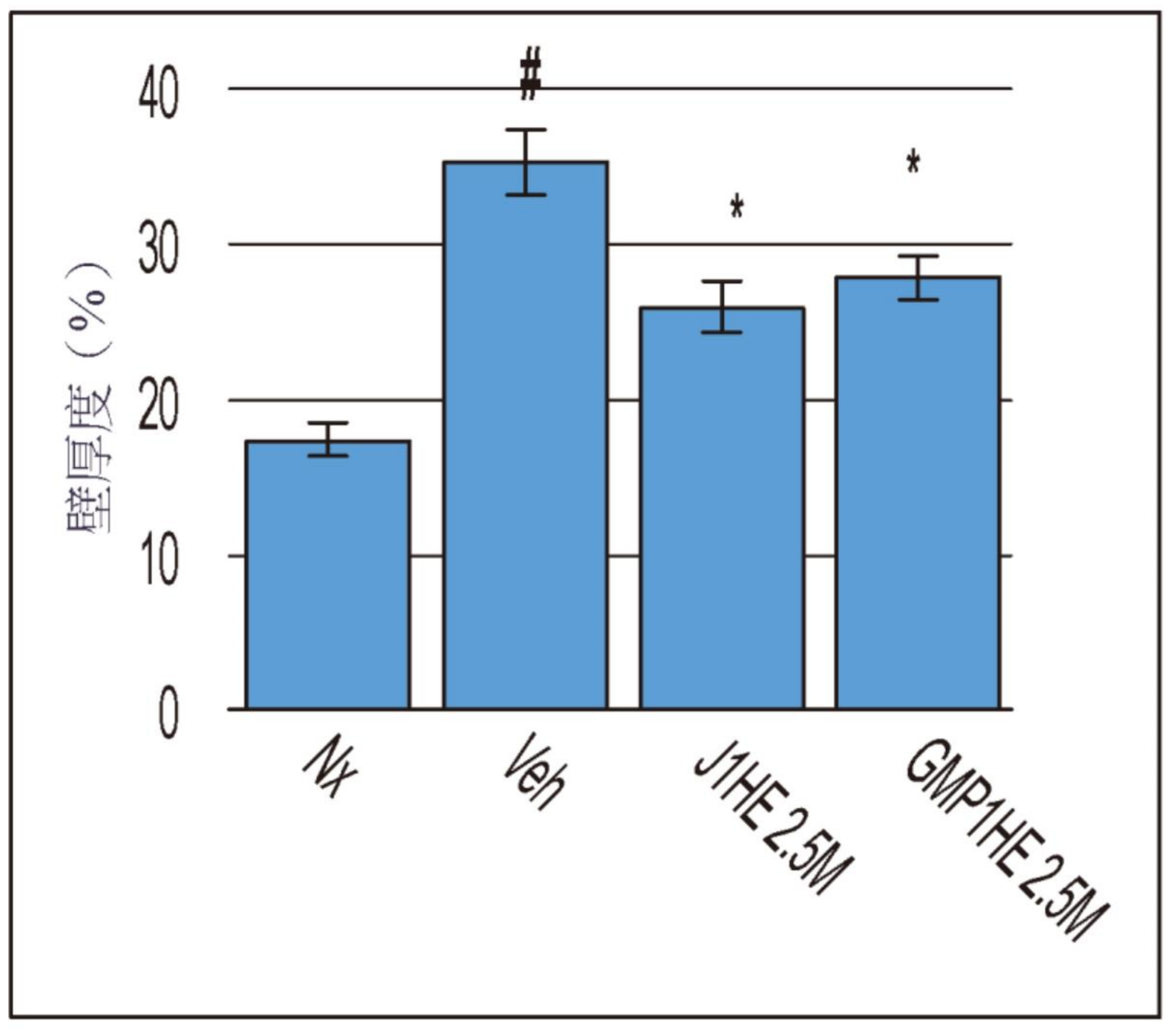


圖15B

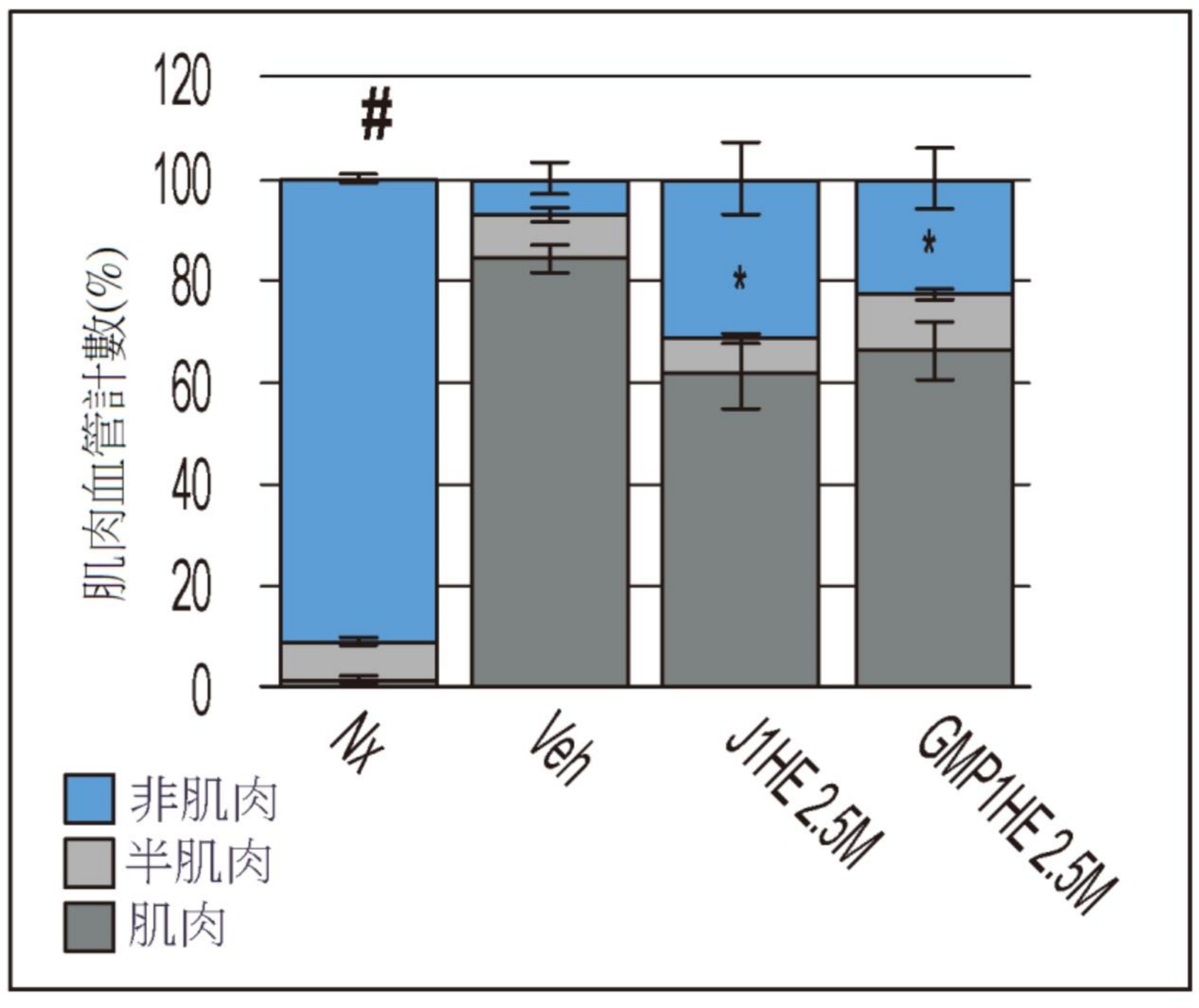


圖15C



圖16A

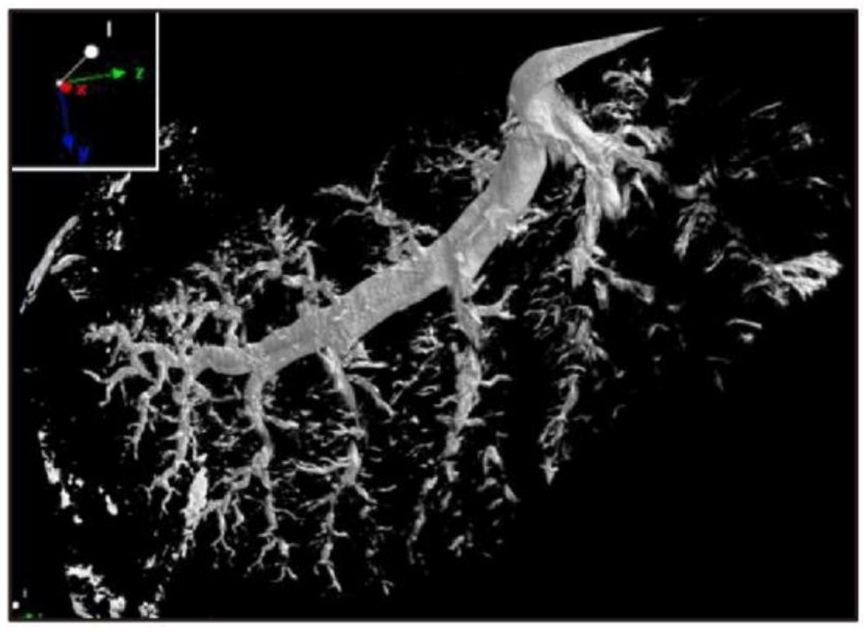


圖16B

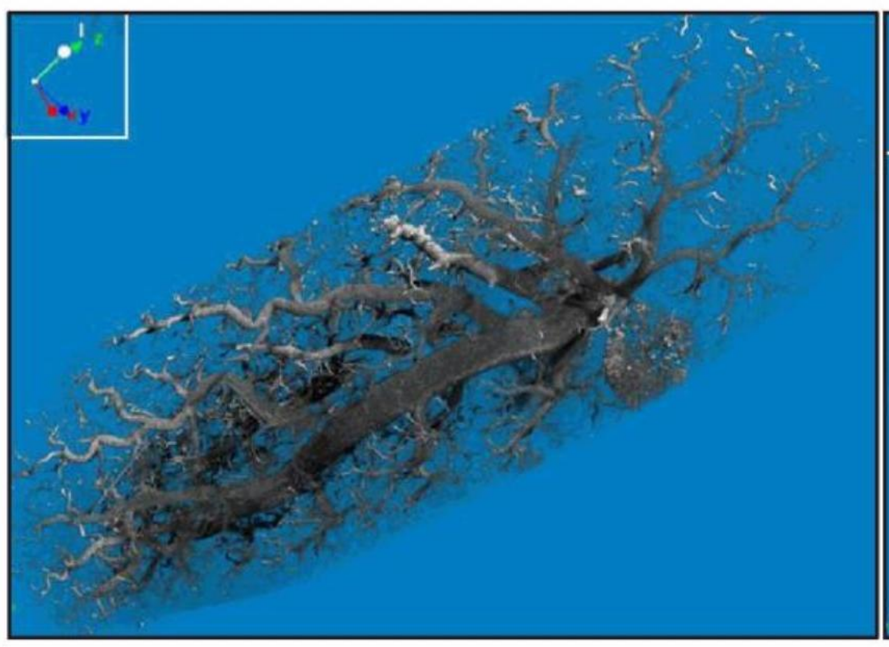


圖16C



圖 16D

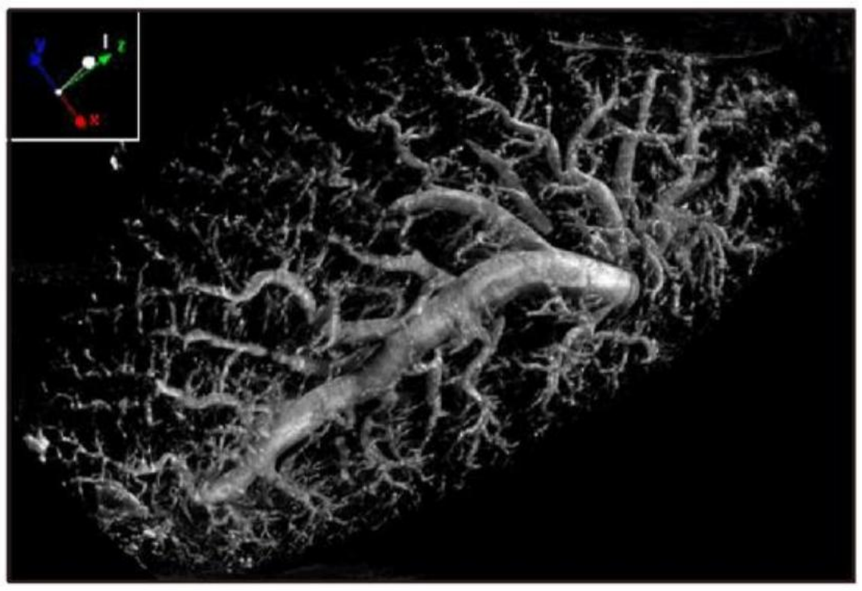


圖16E

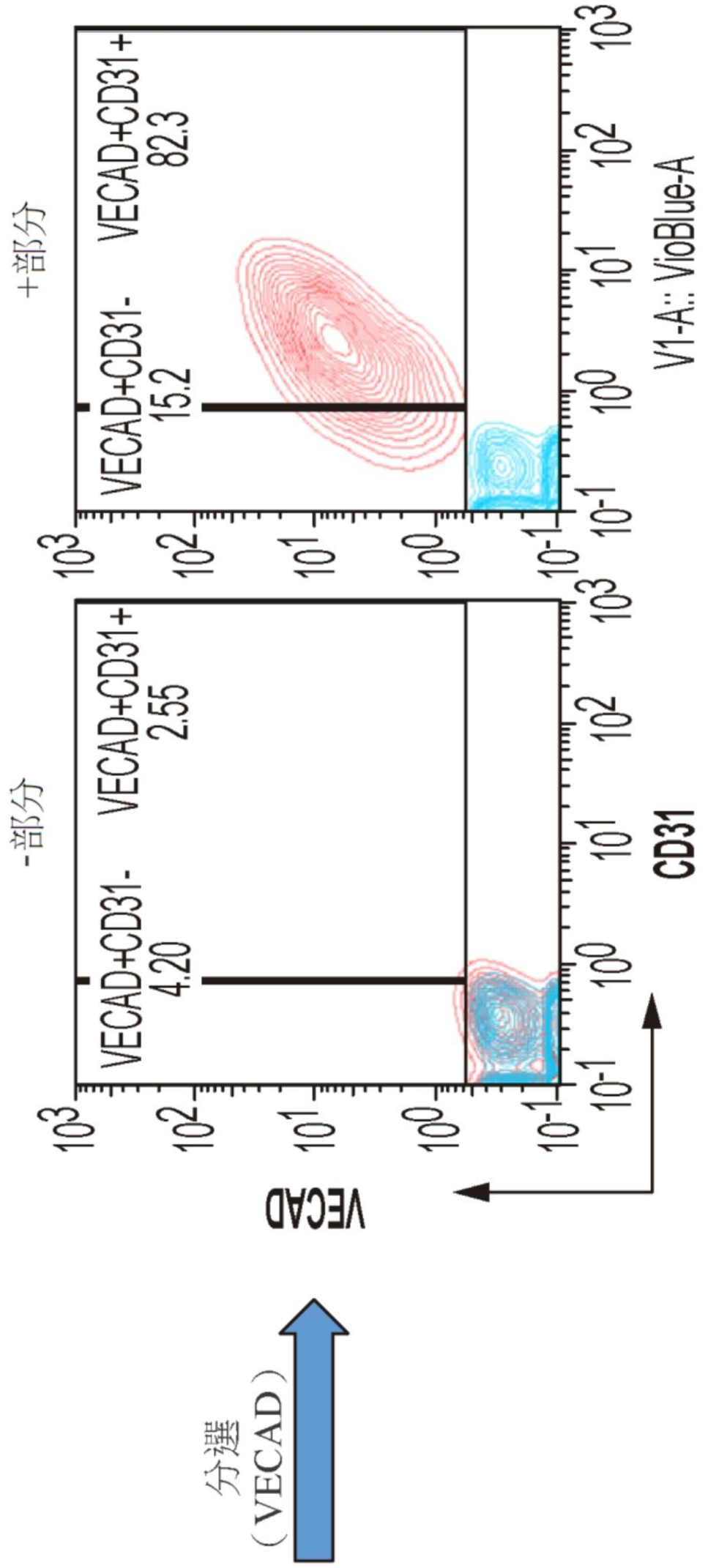

+部分
VECAD+CD31-
15.2
VECAD+CD31+
82.3
V1-A:: VioBlue-A
-部分
VECAD+CD31-
4.20
VECAD+CD31+
2.55
VECAD
CD31
分選
（VECAD）
未分選
VECAD+CD31-
8.33
VECAD+CD31+
12.7
VECAD
CD31

圖17

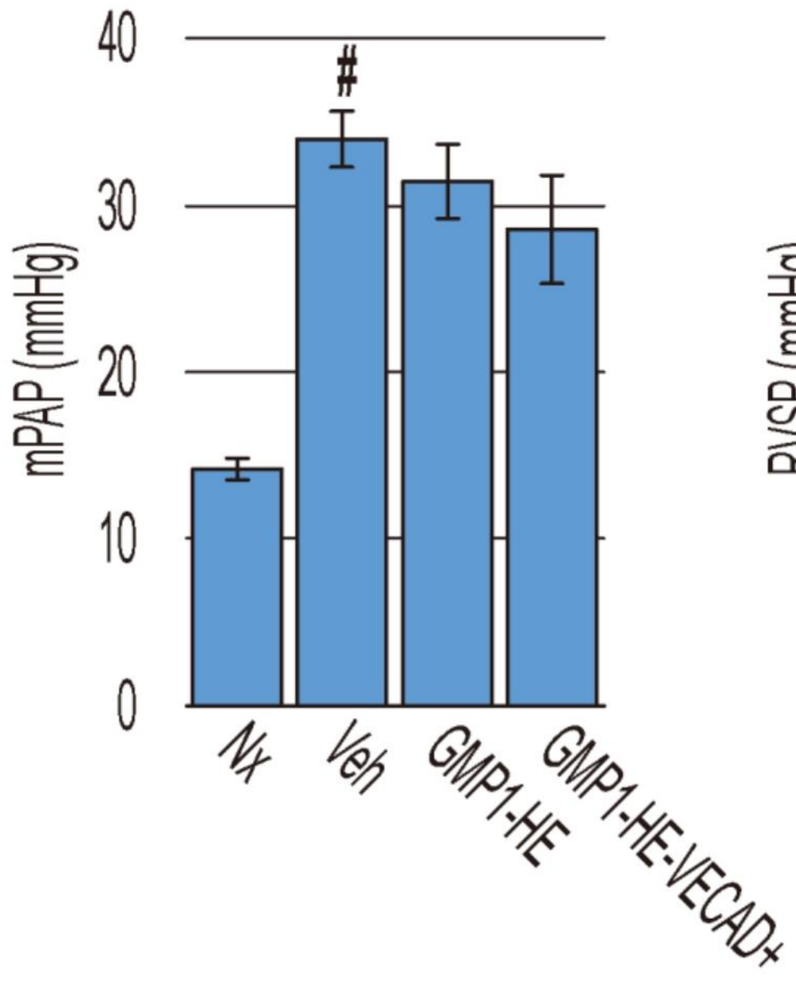


圖18A

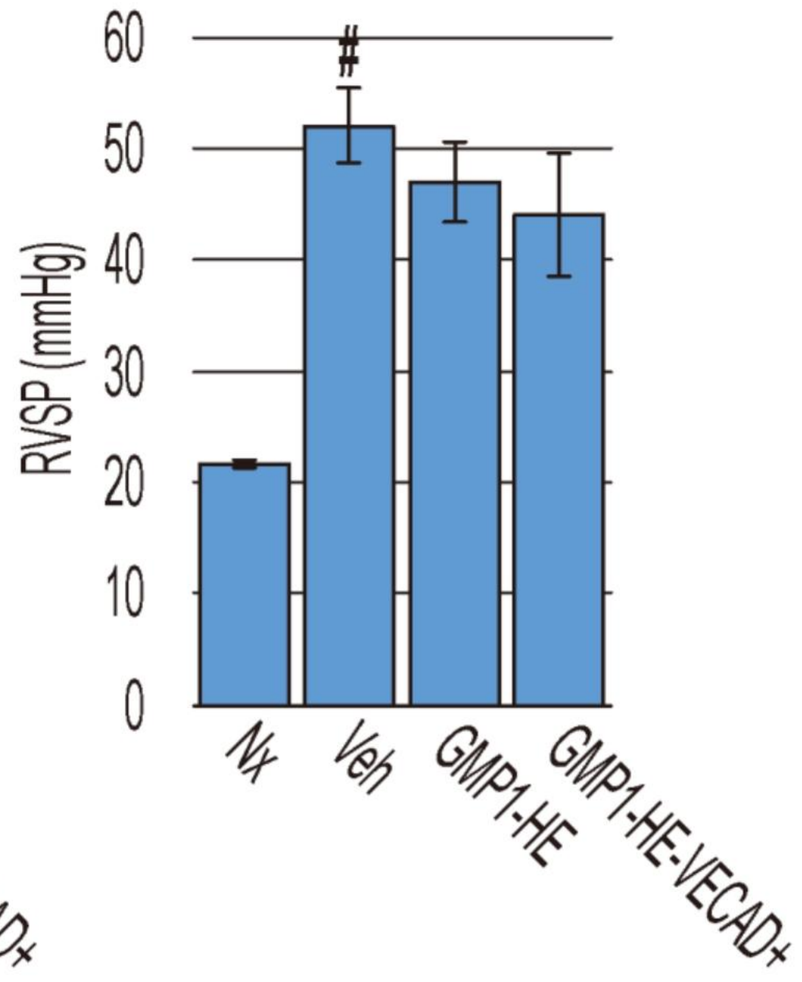


圖18B

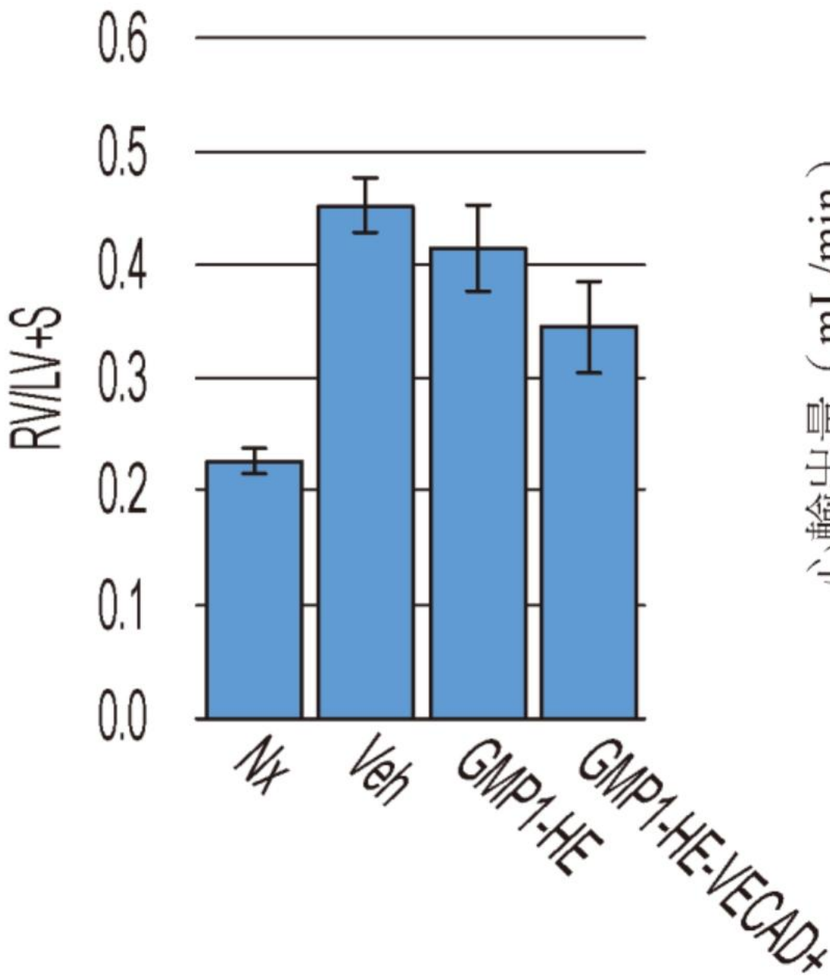


圖18C

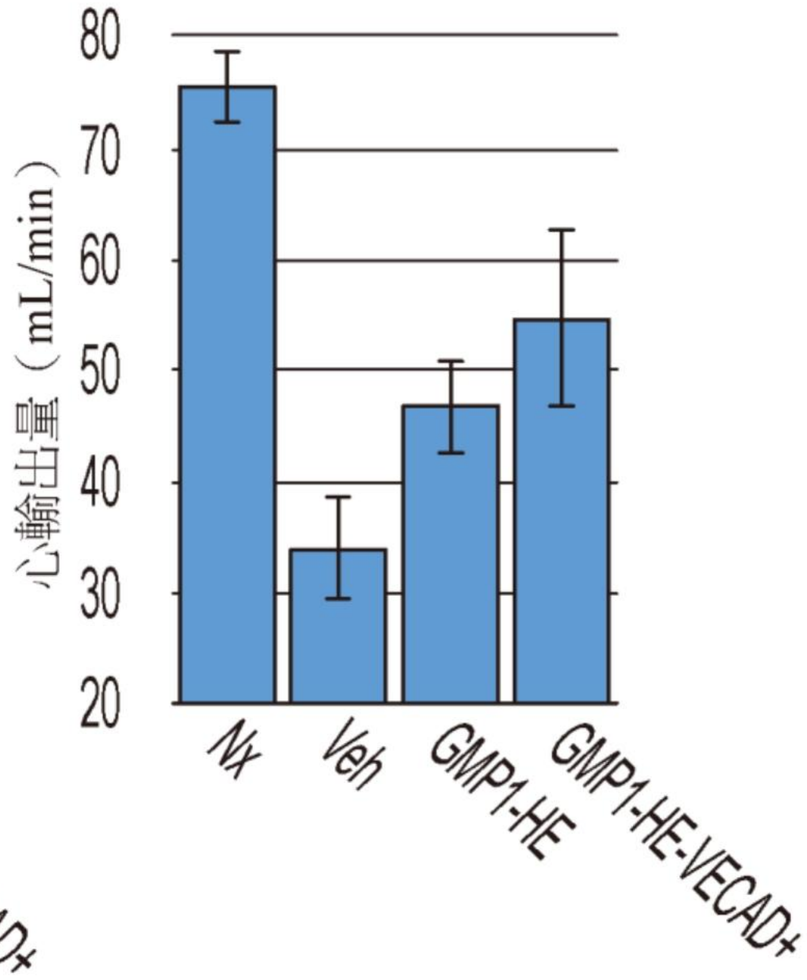


圖18D

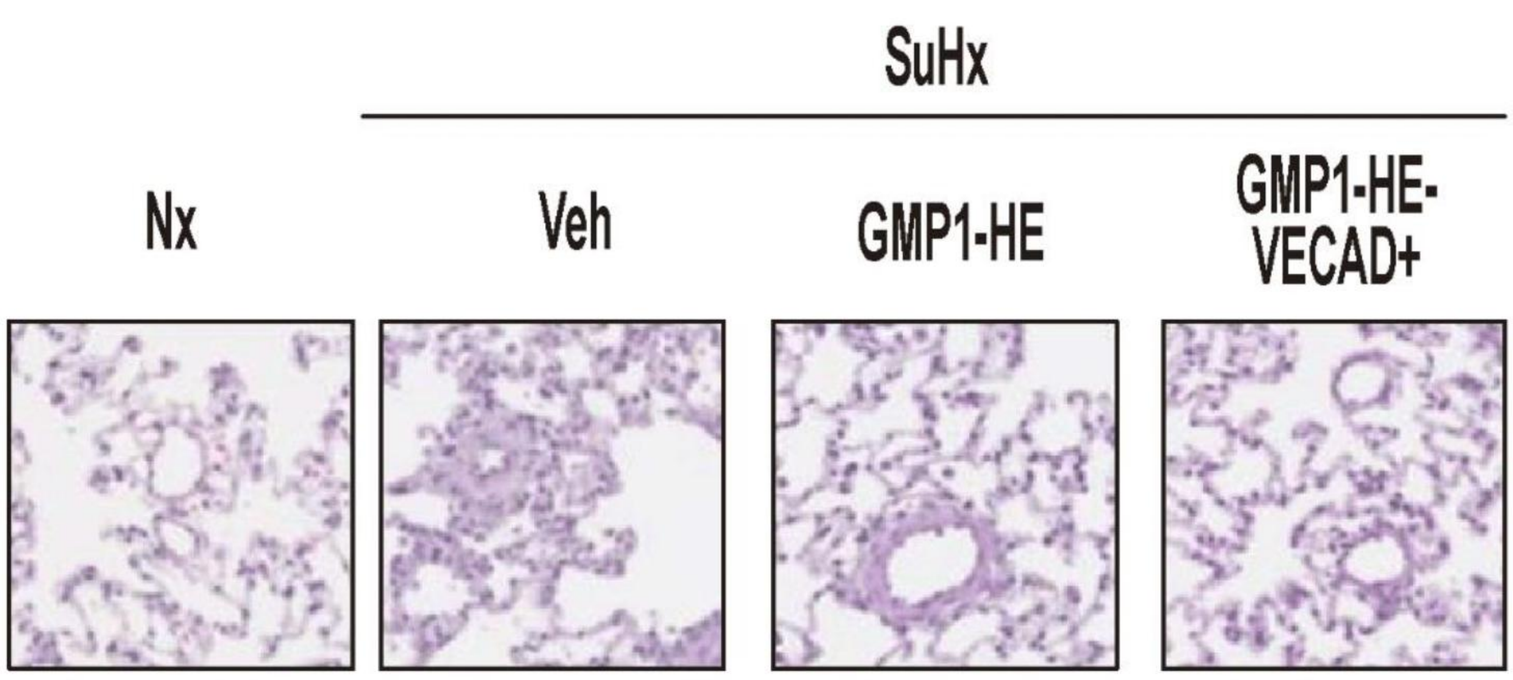


圖18E

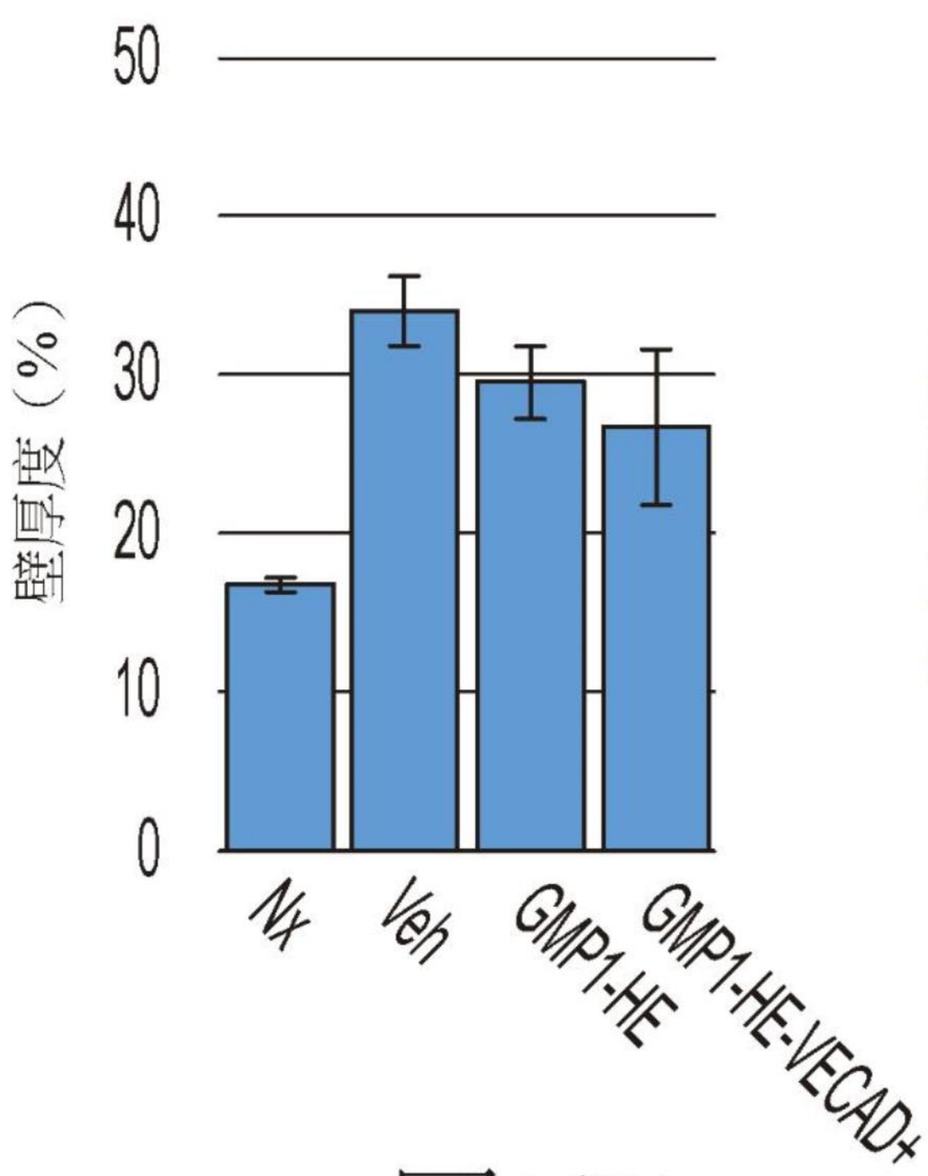


圖18F

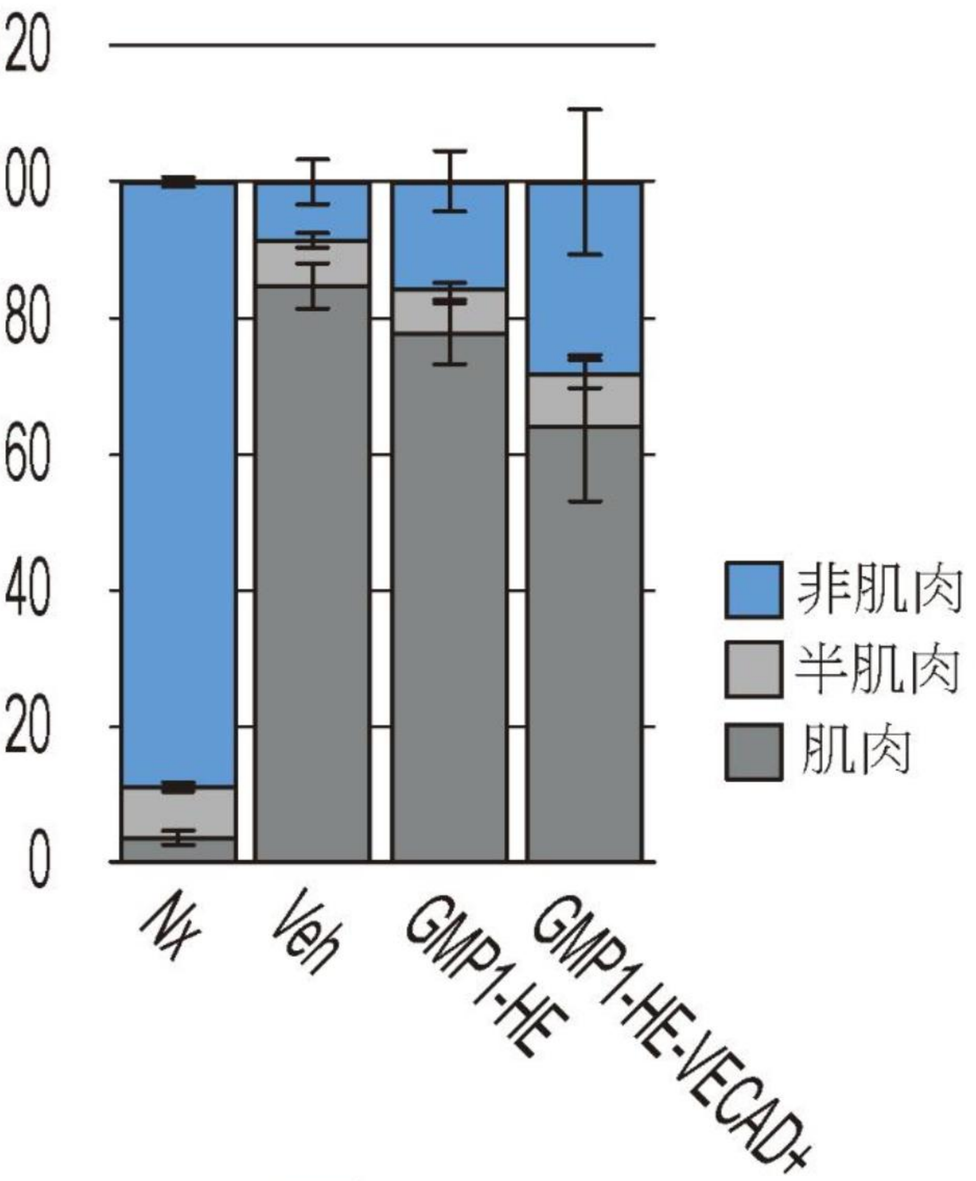
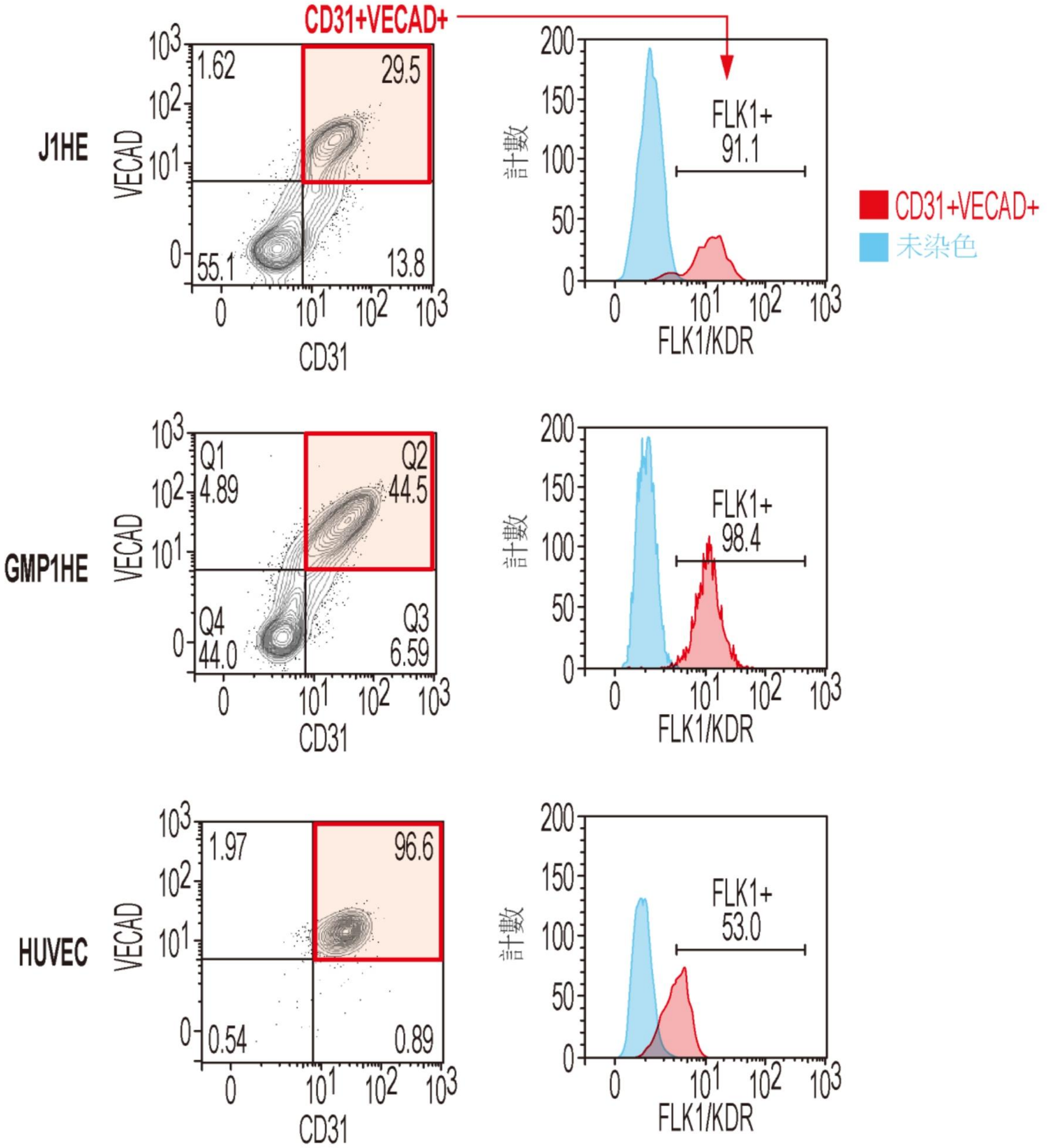


圖18G



	CD31+VECAD+FLK1+
J1HE	26.8%
GMP1HE	43.8%
HUVEC	51.2%

圖19