(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103237886 B
(45)授权公告日 2018.10.30

(21)申请号 201180051144.4
(22)申请日 2011.08.24
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103237886 A
(43)申请公布日 2013.08.07
(30)优先权数据
61/376,508 2010.08.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.04.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/048972 2011.08.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/027474 EN 2012.03.01
(73)专利权人 明尼苏达大学董事会
地址 美国明尼苏达州
专利权人 鲁汶卡柴列克大学
(72)发明人 K·苏巴马廉 胡维硕
C·M·维尔费利 Y·朴
(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
代理人 张广育 孙占华
(51)Int.Cl.
C12N 5/07(2006.01)
(56)对比文件
WO 2009092092 A1,2009.07.23,第51-53、125、138、140、145、173段.
郑学胜等.神经干细胞团的悬浮不稳定性及其解决方法.《中国生物医学工程学报》.2006,第25卷(第5期),607-612.
审查员 温婧
权利要求书1页 说明书39页 附图29页

(54)发明名称

细胞集合体的非静态悬浮培养

(57)摘要

本发明涉及细胞集合体的组合物以及制备和使用所述细胞集合体的方法,其中所述集合体包括非胚胎干细胞但可分化为外胚层胚胎胚层、内胚层胚胎胚层和中胚层胚胎胚层中的至少两种的细胞类型的细胞,例如干细胞。

CN 103237886 B

1.一种制备非静态细胞培养组合物的方法，所述方法包括用非胚胎干细胞集合体接种细胞培养物并扩增所接种的集合体，从而使扩增产生5×10^4个细胞/ml至10^8个细胞/ml的细胞密度，其中所述集合体被接种到非静态培养条件中并被扩增，其中所述集合体中的细胞为多能成体祖细胞MAPC，特征在于它们表达端粒酶、未被转化并具有正常的核型。

2.权利要求1的方法，其中所述MAPC可分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系中的至少两种的细胞类型。

3.权利要求2的方法，其中所述MAPC可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的细胞类型。

4.权利要求1-3中任一项的方法，其中所述MAPC表达oct4。

5.权利要求1-3中任一项的方法，其中所述MAPC已经在培养中经历10-40次细胞倍增。

6.权利要求4的方法，其中所述MAPC已经在培养中经历10-40次细胞倍增。

7.权利要求1-3中任一项的方法，其中所述细胞已经在培养中经历至少40次细胞倍增。

8.权利要求4的方法，其中所述细胞已经在培养中经历至少40次细胞倍增。

9.权利要求5的方法，其中所述细胞已经在培养中经历至少40次细胞倍增。

10.权利要求6的方法，其中所述细胞已经在培养中经历至少40次细胞倍增。

11.权利要求1-3中任一项的方法，其中所述MAPC表达rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

12.权利要求4的方法，其中所述MAPC表达rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

13.权利要求5的方法，其中所述MAPC表达rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

14.权利要求6的方法，其中所述MAPC表达rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

15.权利要求7的方法，其中所述MAPC表达rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

16.权利要求8的方法，其中所述MAPC表达rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

17.权利要求9的方法，其中所述MAPC表达rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

18.权利要求10的方法，其中所述MAPC表达rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

细胞集合体的非静态悬浮培养

技术领域

[0001] 本发明涉及包括高浓度细胞集合体的细胞培养组合物，以及制造所述高浓度细胞集合体的方法。所述集合体可包括干细胞。干细胞可包括非胚胎干细胞、非生殖细胞、非胚胎生殖细胞的细胞，并且其表达一种或多种多能性标志物。所述细胞可分化为外胚层胚胎胚层、内胚层胚胎胚层和中胚层胚胎胚层中至少两种的细胞类型。

背景技术

[0002] 干细胞大规模培养

[0003] 随着干细胞用于细胞治疗和药物毒性筛选的潜力的增长，有不断增长的设计用于干细胞的可放大扩增和分化的强大生物过程的需要。因此，为满足每次治疗约10^9-10^{10}个细胞的临床需要，需要工作体积在100ml至几升的范围的生物反应器。

[0004] 悬浮培养已被用于鼠和人胚胎干细胞(ESC)的扩增和分化，这是通过将它们作为集合体或在微载体上培养(Abranches et al.2007;Cameron et al.2006;Cormier et al.2006;Dang et al.2004;Fok and Zandstra2005;Krawetz et al.2009;Lock and Tzanakakis2009;Oh et al.2009;zur Nieden et al.2007)。也可在悬浮液中培养成体干细胞，例如造血干细胞和祖细胞(Li et al.2006)、神经干细胞(Gilbertson et al.2006)和间充质干细胞(MSC)(Frauenschuh et al.2007;Yu et al.2009)。大多数涉及MSC的研究已经将细胞接种到微载体上(Frauenschuh et al.2007)或植入到3D聚合物支架内(Zhao and Ma2005)。在最近的研究中，作为多细胞三维(3D)集合体的MSC的培养被证明可作为另一种在悬浮液中培养的模式(Frith et al.2009)。除了在旋转培养系统中进行大规模细胞生产的益处外，有越来越多的证据表明，3D集合体比传统的二维(2D)单层培养方法有显著更好的体内表型和生物反应的重演性。这被认为是由于细胞-细胞和细胞-基质相互作用、细胞形状、空间梯度的差异，导致了基因和蛋白质表达的差异。因此，这些3D系统的潜在应用还可扩展到开发“仿生”3D组织/类器官，以及作为研究分化、器官发生、迁移、肿瘤生物学和高通量药物筛选的体外模型(Griffith and Swartz2006;Keller et al.2006;Liu et al.2009;Ong et al.2009;Pampaloni et al.2007;Yamada and Cukierman2007)。

发明内容

[0005] 发明人发现，干细胞集合体——即使是在静态培养中形成，当在非静态条件例如搅拌的悬浮液中进一步培养时可继续增大。这些起始集合体可在这些条件下继续生长的事实表明，非静态细胞培养中的生长对作为集合体的细胞的细胞增殖和生长来说不是破坏性的。现在可以实现这一点的事实使得可产生高密度的干细胞培养物，这对临床应用来说是实用且需要的。因此，本发明的实施方案包括但不限于以下这些。

[0006] 本发明提供一种细胞培养组合物，其包括非静态细胞培养的干细胞集合体，其中所述细胞密度范围可为约5×10^4个细胞/ml至10^8个细胞/ml。

[0007] 可用从例如拟胚体形成的集合体来接种所述高密度培养物。在这些拟胚体中，所

述集合体的最大尺寸可以为约500μm。每集合体的最大细胞数可以为约25,000。

[0008] 在所述非静态培养中,所接种的(初始)集合体可生长至每集合体中约50,000个细胞的平均最大值,平均最大直径为约1mm。

[0009] 在一个实施方案中,所述非静态培养中形成的集合体的尺寸范围为约10μm-1mm。

[0010] 在一个实施方案中,所述非静态细胞培养中的细胞密度范围为约5×10^4-10^8个细胞/ml。

[0011] 在一个实施方案中,所述非静态细胞培养的体积范围为约10ml-20000L。

[0012] 在一个实施方案中,所述非静态细胞培养是非贴壁的。

[0013] 非贴壁细胞培养的类型包括但不限于,实验室旋转瓶、摇瓶和混合釜生物反应器。

[0014] 本发明还提供了制备上述组合物的方法。所述方法包括将集合体接种到非静态细胞培养条件中,并培养扩增这些集合体,直到它们达到需要的尺寸(细胞数)并且每ml的细胞数达到需要的密度。

[0015] 因此,本发明涉及一种通过将细胞集合体引入到非静态细胞培养来制备细胞培养组合物的方法,在所述非静态细胞培养中每集合体的平均细胞数增加。

[0016] 增加的范围可从约2倍至5,000倍。例如,起始时平均起始数为10个细胞的集合体可生长为平均细胞数为50,000或更多的集合体。

[0017] 因此,最高范围为约5,000×。在这种情况中,以约10个细胞(平均)的集合体起始并增长至约50,000个细胞(平均)的集合体,是增长5,000×。以约100个细胞的集合体起始并增长至约50,000个细胞的集合体,是约增长500×。以约1,000个细胞的集合体起始并增长至约50,000个细胞的集合体,是增长50×。以约5,000个细胞的集合体起始并增长至约50,000个细胞的集合体,是增长10×。因此,可以从下限为约10个细胞至上限甚至为约25,000个细胞的集合体起始。然后,可以使这些集合体的每个达到约50,000个细胞的上限或达到少于50,000个细胞的集合体大小。起始的集合体越小,就必须增加越高的倍数来获得非常大的集合体,例如25,000至50,000个细胞。起始的集合体越大,必须增加的倍数就越小。

[0018] 因此,在悬浮培养物中可保持为完整集合体的每个集合体中的平均细胞数的范围可以为(每集合体)5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、约20,000至25,000、约25,000至30,000、约30,000至35,000、约35,000至40,000、约40,000至45,000、约45,000至50,000,并可能更多。中间的范围也被包括在内(例如21,000、22,000等)。初始平均细胞数为约1,000时,本发明涵盖的倍数增加范围最高达约50倍(即每集合体约50,000个细胞),例如10×至15×、15×至20×、20×至25×、25×至30×、30×至35×、35×至40×、40×至45×、45×至50×,以及更高。

[0019] 在一个实施方案中,所述非静态培养中形成的集合体的尺寸范围约为10μm-1mm.

[0020] 在一个实施方案中,所述非静态细胞培养中的细胞密度范围为5×10^4-10^8个细胞/ml。

[0021] 在一个实施方案中,所述非静态细胞培养的体积范围为10ml-20000L。

[0022] 在一个实施方案中,所述非静态细胞培养是非贴壁的。

[0023] 非贴壁细胞培养的类型包括但不限于,实验室培养瓶、旋转瓶、摇瓶和混合釜生物反应器。

[0024] 所述方法还还包括，通过将可药用载体与上述方法所产生的集合体混合来制备药物组合物。

[0025] 所述方法还包括，通过解聚上述方法所产生的集合体来制备源自细胞集合体的细胞。

[0026] 所述方法还包括，通过将源自上述方法所产生的集合体的细胞引入到培养基中来制备细胞培养组合物。

[0027] 所述方法还包括，通过将可药用载体与源自上述方法所产生的集合体的细胞混合来制备药物组合物。

[0028] 所述方法还包括，通过将上述方法所产生的集合体暴露于可产生分化细胞的条件来制备分化的细胞。

[0029] 所述方法还包括，通过将可药用载体与通过将上述方法所产生的集合体暴露于可产生分化细胞的条件而制备的分化细胞相混合来制备药物组合物。

[0030] 所述方法还包括，通过将解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞暴露于可产生分化细胞的条件来制备分化的细胞。

[0031] 本发明还提供一种通过将分化细胞与可药用载体混合来制备药物组合物的方法，所述细胞是通过将解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0032] 所述方法还包括将上述方法所产生的集合体给予受试者。

[0033] 所述方法还包括，将包含可药用载体和上述方法所产生的集合体的药物组合物给予受试者。

[0034] 所述方法还包括，将解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞给予受试者。

[0035] 所述方法还包括，将药物组合物给予受试者，所述药物组合物包含可药用载体和通过解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞。

[0036] 所述方法还包括，将分化的细胞给予受试者，所述分化的细胞是通过将上述方法所产生的集合体暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0037] 所述方法还包括，将包含可药用载体和分化细胞的药物组合物给予受试者，所述分化细胞是通过将上述方法所产生的集合体暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0038] 所述方法还包括，将分化的细胞给予受试者，所述分化的细胞是通过将解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0039] 所述方法还包括，将包含可药用载体和分化细胞的药物组合物给予受试者，所述分化细胞是通过将解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0040] 所述方法还包括，通过将上述方法所产生的集合体与试剂接触并检测所述试剂对集合体中细胞的影响来鉴定活性试剂。

[0041] 本发明还提供一种通过将解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞与试剂接触并检测所述试剂对所述源自集合体的细胞的影响来鉴定活性试剂的方法。

[0042] 所述方法还包括一种通过给予治疗有效量的上述方法所产生的集合体来治疗需要治疗的受试者中的病症的方法。

[0043] 所述方法还包括一种通过给予治疗有效量的药物组合物来治疗需要治疗的受试

者中的病症的方法，所述药物组合物包括可药用载体和上述方法所产生的集合体。

[0044] 所述方法还包括一种通过给予治疗有效量的解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞来治疗需要治疗的受试者中的病症的方法。

[0045] 所述方法还包括一种通过给予治疗有效量的药物组合物来治疗需要治疗的受试者中的病症的方法，所述药物组合物包括可药用载体和通过解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞。

[0046] 所述方法还包括一种通过给予治疗有效量的分化细胞来治疗需要治疗的受试者中的病症的方法，所述分化细胞是通过将上述方法所产生的集合体暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0047] 所述方法还包括一种通过给予治疗有效量的药物组合物来治疗需要治疗的受试者中的病症的方法，所述药物组合物包括可药用载体和分化细胞，所述分化细胞是通过将上述方法所产生的集合体暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0048] 所述方法还包括一种通过给予治疗有效量的分化细胞来治疗需要治疗的受试者中的病症的方法，所述分化细胞是通过将解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0049] 所述方法还包括一种通过给予治疗有效量的药物组合物来治疗需要治疗的受试者中的病症的方法，所述药物组合物包括可药用载体和分化细胞，所述分化细胞是通过将解聚上述方法所产生的集合体而产生的细胞暴露于可产生分化细胞的条件而产生的。

[0050] 根据以上陈述，所述细胞集合体可包括非胚胎干细胞、非胚胎生殖细胞、非生殖细胞的细胞，可分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系中的至少两种细胞类型，并且/或者表达一种或多种多能性标志物。

[0051] 本发明涉及的细胞可表达多能性标志物，例如oct4。它们还可以表达与延长复制能力相关的标志物，例如端粒酶。其他的多能性特征可以包括分化为多于一种胚层，例如外胚层胚胎胚层、内胚层胚胎胚层和中胚层胚胎胚层的两种或三种，的细胞类型的能力。在培养物中这种细胞可以是或可以不是永生化的或转化的。所述细胞可以高度扩增而不转化并维持正常的核型。例如，在一个实施方案中，所述非胚胎干细胞、非生殖细胞可以在培养物中经历至少10-40次细胞倍增，例如50次、60次或更多次，其中所述细胞没有转化并具有正常核型。所述细胞可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的两种中每一种的至少一种细胞类型，并可以包括分化为所有的三种谱系。进一步地，所述细胞可以是不致瘤的，例如不会产生畸胎瘤。如果细胞是转化的或致瘤的，并且需要使用它们来侵入，通过防止细胞增殖形成肿瘤的处理，这种细胞可以失能，因此它们不会在体内形成肿瘤。这种处理在本领域内是众所周知的。

[0052] 细胞包括但不限于以下编号的实施方案：

[0053] 1.分离的扩增非胚胎干细胞、非生殖细胞，所述细胞已经在培养物中经历至少10-40次细胞倍增，其中所述细胞表达oct4，没有转化并具有正常的核型。

[0054] 2.如以上1所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其还表达端粒酶、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0055] 3.如以上1所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的至少两个中的至少一种细胞类型。

[0056] 4.如以上3所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其还表达端粒酶、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0057] 5.如以上3所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的每个的至少一种细胞类型。

[0058] 6.如以上5所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其还表达端粒酶、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0059] 7.分离的扩增非胚胎干细胞、非生殖细胞，是通过培养非胚胎、非生殖组织获得的，所述细胞已经在培养物中经历至少40次细胞倍增，其中所述细胞没有转化并具有正常的核型。

[0060] 8.如以上7所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其表达oct4、端粒酶、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0061] 9.如以上7所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的至少两个中的至少一种细胞类型。

[0062] 10.如以上9所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其表达oct4、端粒酶、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0063] 11.如以上9所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的每个的至少一种细胞类型。

[0064] 12.如以上11所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其表达oct4、端粒酶、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0065] 13.分离的扩增非胚胎干细胞、非生殖细胞，所述细胞已经在培养物中经历至少10-40次细胞倍增，其中所述细胞表达端粒酶，没有转化，并具有正常的核型。

[0066] 14.如以上13所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其进还表达oct4、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0067] 15.如以上13所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的至少两个中的至少一种细胞类型。

[0068] 16.如以上15所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其还表达oct4、rex-1、rox-1、或sox-2中的一种或多种。

[0069] 17.如以上15所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的每个的至少一种细胞类型。

[0070] 18.如以上17所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其还表达oct4、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0071] 19.分离的扩增非胚胎干细胞、非生殖细胞，其可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的至少两个中的至少一种细胞类型，所述细胞已经在培养物中经历至少10-40次细胞倍增。

[0072] 20.如以上19所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其表达oct4、端粒酶、rex-1、rox-1或sox-2中的一种或多种。

[0073] 21.如以上19所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其可以分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的每个的至少一种细胞类型。

[0074] 22.如以上21所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞，其表达oct4、端粒酶、rex-1、rox-

1或sox-2中的一种或多种。

[0075] 上文所述的细胞可从任何需要的组织来源制备，包括但不限于骨髓、脐带血、脐带基质、外周血、胎盘、胎盘血、肌肉、脑、肾和其他实体器官。它们还可源自分泌的流体，例如尿和月经血。

[0076] 在一个实施方案中，所述细胞源自人组织。

[0077] 39.在一个实施方案中，所述集合体中的细胞和源自所述集合体的细胞表达oct3/4、端粒酶、rex-1、rox-1、nanog、GATA6和sox-2中的一种或多种。

[0078] 40.在一个实施方案中，所述集合体中的细胞和源自所述集合体的细胞可分化为内胚层胚胎谱系、外胚层胚胎谱系和中胚层胚胎谱系的全部三种细胞类型。

[0079] 41.在一个实施方案中，通过使所述集合体或源自所述集合体的细胞分化而产生的分化细胞可表达内胚层分化标志物。

[0080] 42.在一个实施方案中，通过使所述集合体或源自所述集合体的细胞分化而产生的分化细胞可表达外胚层分化标志物。

[0081] 43.在一个实施方案中，通过使所述集合体或源自所述集合体的细胞分化而产生的分化细胞可表达中胚层分化标志物。

[0082] 44.在一个实施方案中，通过使所述集合体或源自所述集合体的细胞分化而产生的分化细胞表型，具有选自肝细胞、胰岛B细胞和神经元的细胞的特征。

[0083] 45.在一个实施方案中，所述集合体为约100μm-800μm并且在培养物中的密度为10^5-10^8个细胞/ml。

[0084] 46.本发明还提供了本文的组合物，其中起始细胞是通过悬滴法或强制聚集方法而聚集的。

[0085] 47.本发明还提供了本文的方法，其中所述病症为肝脏疾病或病症、GVHD、心肌梗死、充血性心力衰竭、糖尿病、造血移植、外伤性脑损伤、脊髓损伤或中风。

[0086] 48.本发明还提供了本文的方法，其中所述病症包括受损的组织，所述组织为心脏、神经元、眼、软骨、骨、骨骼肌、平滑肌、骨髓、脾、肝脏、肺、脑、免疫系统、结缔组织、血管、胰腺、CNS、PNS和肾组织的一种或多种。

[0087] 在本发明的以上陈述中，源自所述集合体的细胞可保持分化能力和/或表达所述聚集细胞的多能性标志物(例如上文列出的那些)。

附图说明

[0088] 图1示出了用于从单层(2D)培养的大鼠MAPC形成集合体的悬滴法以及随后的分化。在MAPC培养基和5%氧气中的悬滴中形成集合体4-5天后，将细胞集合体转移到超低附着板以在相应的分化培养基中分化。右侧子图示出了2D单层中的细胞、未分化的细胞集合体和分化的细胞集合体的形态。

[0089] 图2示出了在不同培养基条件下从大鼠MAPC形成的集合体。在最佳MAPC培养基条件下，所述集合体生长为有明确边界的球状簇。从MAPC培养基中去除LIF诱导形成了对应于分化早期征兆的有不规则边界的集合体。在分化基础培养基中，所述细胞集合体由于非最佳的生长条件而小很多。

[0090] 图3示出了表达oct3/4的细胞的百分数(与MAPC的未分化状态相关的转录因子)。

在76%的在2D单层中表达oct3/4的细胞中，70%当在MAPC培养基和5%氧气中形成集合体时在MAPC集合体中仍然保持表达oct3/4。其他条件是不同的培养基组成：-无LIF的MAPC培养基、分化基础培养基，氧气水平的选择-5%(含氧量低)或21%(含氧量正常)。

[0091] 图4示出了在通过悬滴法和强制聚集方法形成的MAPC2D和3D培养物中几种未分化和分化标志物的表达的QRT-PCR比较。不论哪种形成方法，oct3/4和GATA6的表达在2D MAPC和3D MAPC集合体之间都是类似的。在与MAPC2D类似的3D MAPC集合体中，早期内胚层标志物HNF3b和Goosecoid(Gsc)有少量表达，成熟期的内胚层标志物例如AFP、白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶(AAT)和酪氨酸氨基转氨酶(TAT)无表达。

[0092] 图5示出了7天中在MAPC培养基和5%氧气中的2D培养中由低oct3/4的MAPC形成的低oct3/4的MAPC集合体。在分化基础培养基和21%氧气中自发分化时，集合体分化为形态上像脂肪细胞和成纤维细胞的细胞。

[0093] 图6示出了受胰蛋白酶作用并重新铺板到纤连蛋白包被的培养皿中的在MAPC培养基和5%氧气中的高oct3/4的MAPC集合体。所述细胞的形态是典型的MAPC，它们能够进行显示为细胞数随着时间而增加的扩增，并可在重新铺板后的第1代(2D PI)和第2代(2D P2)以产生它们的MAPC集合体的表达水平保持表达MAPC标志物oct3/4和GATA6。早期分化标志物例如Goosecoid(Gsc)或Brachyury(Bry)的有少量表达或无表达，更成熟的标志物例如α-胎蛋白(AFP)无表达。

[0094] 图7示出了在有2%血清的分化基础培养基中MAPC集合体的自发多谱系分化。oct3/4的水平随着分化而下降，并观察到三种胚层的标志物——Nestin、Pax6(神经外胚层)、SM22、Flk-1(中胚层)、AFP、白蛋白(内胚层)——的表达增加。

[0095] 图8示出了使用QRT-PCR对MAPC集合体的表征。

[0096] 图9示出了使用多步方案分化的结果。

[0097] 图10示出了21天的分化(10×)后集合体的形态。

[0098] 图11示出了在2D对比3D条件中从维持未分化的大鼠MAPC谱系R2old和19起始定向分化成肝细胞(A)、内皮细胞(B)和神经前体(C)。

[0099] 图12示出了，集合体保持MAPC表型。(a)表面培养的MAPC(□/▩)和MAPC集合体(第4天，▨/■)的多能性、原始内胚层和分化标志物的转录本水平(2个谱系的数据各自显示)。(b)集合体和表面培养的MAPC中Oct4蛋白的流式细胞术测量结果(两种情形中都示出了阴性同种型对照和Oct4抗体处理的样品)(c)Oct4(▨)和AFP(■)的转录本水平，(d)在21%氧气或在分化诱导条件中形成的集合体中Oct4的流式细胞术测量结果(阴性同种型对照和Oct4抗体处理的样品分别显示为红色和蓝色)。

[0100] 图13示出了MAPC集合体的表征。(a)MAPC集合体(第4天)的形态，(比例尺200μm)(b)在集合体形成的最初48小时内集合体大小的变化(c)集合体形成过程中的细胞增殖(e)MAPC集合体的TEM切片(d)E-钙粘蛋白染色。

[0101] 图14示出了MAPC集合体的静态培养。在集合体培养的16天培养物(■/□)中(a)Oct4和(b)AFP转录本水平的变化；(▲/Δ)分化培养基中的集合体。黑色和白色符号表示不同的MAPC谱系(c)，(d)；两个大鼠MAPC谱系中第16天的MAPC集合体中Oct4的流式细胞术测量结果(阴性同种型对照和Oct4抗体处理的样品分别显示为红色和蓝色)。

[0102] 图15示出了源自集合体的MAPC的定向分化(第16天)。(a)神经分化中神经祖细胞(progenitor)标志物Sox2、Nestin、Pax6的转录本水平(b)内皮细胞分化中内皮细胞标志物Flk-1、Ve-钙粘蛋白、vWF、enos的转录本水平(c)肝细胞分化中肝细胞标志物AFP、白蛋白、AAT、TAT的转录本表达(□/▩):表面培养物(▨/■):源自第16天集合体的细胞(显示了两个不同细胞系各自的数据,n=3次分化的均值)。

[0103] 图16示出了在旋转瓶中MAPC细胞集合体的扩增。(a)细胞增殖谱(b)MAPC集合体(第4天)的活体染色(c)MAPC标志物——(■)Oct4;(▲)Rex1;(x)CD31;(●)Sall4;(♦)AFP——的转录本水平(三次旋转瓶试验的平均值)(d)在旋转培养的终点(第4天)以及在对照2D培养(第4天)中在MAPC集合体中Oct4的流式细胞术测量结果(阴性同种型对照和Oct4抗体处理的样品分别显示为红色和蓝色)(e)在从旋转扩增培养的(□):第0天;(▨):第2天;(■):第4天细胞起始的静态培养中在肝细胞分化条件中肝细胞标志物的转录本水平。

[0104] 图17示出了MAPC/原始内胚层标志物的转录本水平,(□):表面培养物(▨):静态培养中的MAPC细胞集合体和(■):悬浮培养中的MAPC细胞集合体。

[0105] 图18示出了,(a)表面培养物(2D MAPC)、细胞集合体(3D MAPC)中纤连蛋白的转录本水平和大鼠一般mRNA水平,(b)MAPC在被纤连蛋白或集合体培养条件培养基(3D CM)或表面培养条件培养基(2D CM)包被的板上或无包被的板上的生长。

[0106] 图19示出了MAPC集合体的重新铺板,(A)在MAPC的表面培养(□)、集合体(第4天,■)和源自集合体的细胞(第2代,■)的重新铺板表面培养中多能性和分化标志物的转录本水平,(B)表面培养的MAPC的形态,(C)源自集合体的细胞的重新铺板表面培养的形态。

[0107] 图20示出了在维持培养基中MAPC(□)和MAPC集合体(第4天,■)的表面培养中,以及在分化培养基中MAPC的表面培养(DM,■)中的细胞周期分布。

[0108] 图21示出了,在静态培养第10天MAPC集合体的形态,以说明来自每个细胞集合体的小团细胞开始出芽。

[0109] 图22示出了另一个大鼠MAPC谱系在旋转瓶中的MAPC集合体的扩增(a)两次扩增试验的细胞增殖谱,(b)MAPC集合体上MAPC标志物的转录本水平(第0天,□;第1次试验第4天,■;第2次试验第4天,■),(c)在第4天在MAPC集合体中Oct4的流式细胞术测量结果(阴性同种型对照和Oct4抗体处理的样品分别显示为红色和蓝色)。

具体实施方式

[0110] 应该理解,本发明不限于本文所述的具体方法、方案、试剂等,因此这些可以变化。本文使用的术语只为描述具体的实施方案的目的,不是意欲限制所公开的发明的范围,所述范围仅由权利要求限定。

[0111] 本文使用的段落标题仅出于组织的目的,而不应被解释为任何形式的对所述主题的限制。

[0112] 除非另外指明,本申请中的方法和技术通常按本领域公知的常规方法和本说明书中引用和论述的多种一般性及更专业的参考文献进行。参见,例如,Sambrook et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2001);Ausubel et al.,Current Protocols in

Molecular Biology,Greene Publishing Associates(1992);和Harlow and Lane, Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1990)。

[0113] 定义

[0114] 用于本文时,以下术语具有如下定义的意义。

[0115] “2D”是指细胞通过附着(粘附)到基质上而生长的细胞培养。这样的细胞形成单层细胞或集落,其中所述细胞各自附着到基质上(其中所述基质不是所述细胞本身)。

[0116] “3D”是指其中的细胞通过细胞相互之间的结合而不是通过与非所述细胞本身的基质结合而作为集合体生长的细胞培养。在本领域中,“3D”可以指粘附到支架或基质上的细胞的生长。但是,用于本文时,3D按上述使用。

[0117] 在一个实施方案中,初始时细胞可生长在基质上,其中一些细胞与所述基质结合(粘附到所述基质),但是进一步生长形成了细胞-细胞结合(聚集),所述细胞-细胞结合不依赖于所述进一步生长的细胞与所述基质的结合(粘附)。细胞饲养层也被认为是基质。因此,细胞附着到饲养层也是一种贴壁培养形式(非集合体),因为所述细胞的附着不是相互的而是附着到饲养层中的细胞。

[0118] ″一″或″一个″在本文中是指一个或多于一个;至少一个。当本文中使用复数形式时,通常包括单数形式。

[0119] “集合体”是指细胞的结合,其中所述结合是由细胞-细胞相互作用而不是由粘附到基质导致的。在2D单层培养中,细胞是相互“结合的”,但是是通过附着到基质材料(例如塑料或表面涂层)的方式。在集合体中,两个或更多细胞通过彼此的生物附着而相互结合。这可以通过表面蛋白,例如胞外基质蛋白。

[0120] “细胞库”是为将来使用而培养和储存的细胞的工业术语。细胞可以储存为小份。它们可以直接从储存中取用或可以在储存后扩增。这很方便以至有可用的“现成的”细胞用来给予。细胞可以是已储存在药用赋形剂中,因此可以直接给予,或者在细胞从储存中释放时可以和适当的赋形剂混合。细胞可以是冷冻的或储存为保留活力的形式。在本发明的一个实施方案中,建立了细胞库,其中的细胞已就需要的性质进行了选择。在从储存释放后,给予所述受试者之前,优选地就所述性质的保留再次测定细胞。然后,具有需要的性质的细胞可以给予所述受试者用于治疗。可以使用来源于要治疗的个体的细胞(来自他们出生前组织例如胎盘、脐带血或脐带基质或在出生后任何时间从所述个体扩增)(自体的)来建立细胞库。或者,细胞库可以含有用于同种异体用途的细胞。主细胞库是细胞的贮存器,以提供可被进一步扩增以提供用于给予受试者的剂量的小份细胞。

[0121] “临床相关的”细胞数是指足够影响临床反应的细胞数;即受试者中不需要的病理状态的预防、减少、改善等。具体的实施方案关于足以建立主细胞库的细胞数。

[0122] “共给予”是指彼此结合、一起、配合地给予,包括同时或依次给予两种或多种试剂。

[0123] 在没有其他限制的情况下,“包含”是指必须包括所指事物,但不对其他可包括的事物进行限制或排除。例如,“包含x和y的组合物”包括含有x和y的任何组合物,而不管所述组合物中是否存在其他组分。同样,“包含步骤x的方法”包括其中进行x(不管x是所述方法中的唯一步骤还是只是步骤之一)的任何方法,不管可能存在多少其他步骤,也不管x与这

些步骤相比多么简单或复杂。“包括”和使用词根“含”的类似短语在本文中用作“包含”的同意词并具有相同的含义。

[0124] “包括”是“包含”的同义词(见上)。

[0125] “条件细胞培养基”是本领域公知的术语,指细胞已在其中培养的培养基。本文中这是指将细胞培养足够的时间以分泌可有效地达到所需效果的因子。

[0126] 条件细胞培养基是指细胞已在其中培养从而将因子分泌到所述培养基中的培养基。细胞可通过足够数量的细胞分裂来生长以产生有效量的所述因子,使得所述培养基具有所述效果。可通过本领域任何已知的方法将细胞从所述培养基中除去,所述方法包括但不限于离心、过滤、免疫耗竭(例如通过加标记的抗体和磁性柱)和FACS分选。

[0127] “分散物”是指源自所述集合体并且保留了集合体形式中细胞的功能——仍然可以分化为多于一种胚层的细胞类型和/或表达如本文所公开的多能性标志物——的细胞。

[0128] “有效量”通常指可提供需要的局部或全身效果的量。例如,有效量是足以实现有益或需要的临床效果的量。所述有效量可以单次给药的形式一次全部提供或以多次给药提供所述有效量的形式分份提供。对什么量会被认为是有效量的准确确定可基于每个受试者的个人因素,包括他们的身高体重、年龄、损伤和/或待治疗的疾病或损伤以及距损伤发生或疾病开始的时间。本领域技术人员能够基于这些本领域中惯常的考虑确定给予受试者的有效量。当用于本文时,“有效剂量”与“有效量”意义相同。

[0129] “有效剂量”通常指可提供需要的局部或全身效应(例如增强的表现)的量。例如,有效剂量是足以实现有益或需要的临床结果的量。所述剂量可在一次或多次给药中给予并可包括任意预先选择的量的细胞。对多少量会被认为是有效剂量的准确确定可基于每个受试者的个人因素,包括他们的身高体重、年龄、损伤和/或待治疗的疾病或损伤以及距损伤发生或疾病开始的时间。本领域技术人员,尤其是医师,能够确定可构成有效剂量的细胞数。

[0130] “有效途径”通常是指提供用于将一种试剂送递至所需腔室、系统或位置的途径。例如,有效途径是给予试剂以在所需的作用位点提供量足以实现有益或所需的临床效果的所述试剂的途径。

[0131] “胚胎干细胞(ESC)”为本领域所熟知并已从多种不同哺乳动物种中制得。胚胎干细胞是源自被称为胚泡的早期胚胎的内细胞团的干细胞。它们能够分化为三种原胚层:外胚层、内胚层和中胚层的所有衍生物。这些包括成体内超过220种细胞类型的每一种。ES细胞可成为体内除胎盘外的任何组织。只有桑椹胚细胞是全能性的,能够成为所有组织和胎盘。某些类似于ESC的细胞可以通过将体细胞核转移到去细胞核的受精卵来产生。

[0132] ES(和EG)细胞可通过用SSEA1(小鼠)和SSEA4(人)的抗体进行的阳性染色来鉴别。在分子水平,ES和EG细胞表达许多这些未分化细胞特有的转录因子。这些转录因子包括oct3/4和rex-1。还发现了LIF-R(小鼠中)和转录因子sox-2和rox-1。Rox-1和sox-2还在非ES细胞中表达。ES细胞的标志为端粒酶活性,其可为这些细胞提供无限的体外自我更新潜能。参见,例如,美国专利No.5,453,357、5,656,479、5,670,372、5,843,780、5,874,301、5,914,268、6,110,739、6,190,910、6,200,806、6,432,711、6,436,701、6,500,668、6,703,279、6,875,607、7,029,913、7,112,437、7,145,057、7,153,684和7,294,508,其各自以引用的方式纳入本文以教导ES细胞以及制备所述ES细胞的方法。ES细胞已被以集合体形式培

养。当不附着到基质上培养时，它们能够形成拟胚体。

[0133] oct3/4(在人中是oct3)是在原肠形成前期胚胎、卵裂期早期胚胎、囊泡内细胞团的细胞和胚胎癌(EC)细胞中表达的转录因子(Nichols et al.,Cell95:379-91(1998))，当细胞被诱导分化时其表达下调。oct3/4的表达在胚胎发生和分化的早期确定性步骤中起重要作用。Oct3/4与rox-1联合导致了锌指蛋白rex-1的转录激活，oct3/4也是维持未分化的ES细胞需要的(Rosfjord and Rizzino,Biochem Biophys Res Commun 203:1795-802(1997);Ben-Shushan et al.,Mol Cell Biol18:1866-78(1998))。另外，在ESC/EC中表达，但也在其他分化程度更高的细胞中表达的sox-2，与oct3/4一起是保持未分化状态所需要的(Uwanogho et al.,Mech Dev49:23-36(1995))。鼠ES细胞和原始生殖细胞的维持需要LIF的存在。在人中oct3/4基因被转录为至少两种剪接变体：oct3A和oct3B。所述oct3B剪接变体出现在很多分化细胞中，而oct3A剪接变体(以前也称为oct3/4)被报告是未分化的ES细胞特有的。参见Shimozaki et al.Development130:2505-12(2003)。

[0134] “扩增”是指细胞的增殖，不发生分化。

[0135] 使用术语“包括”并非意图进行限制。例如，说，干细胞“包括”IPS细胞并不意味着排除其他干细胞。

[0136] “增加”意指在预先没有存在时完全诱导，或者程度增加。

[0137] “诱导的多能干细胞(IPSC或IPS细胞)”是被再编程的体细胞，例如通过引入赋予所述体细胞分化程度较低的表型的外源基因产生的体细胞。然后，这些细胞可被诱导分化为分化程度较低的后代。使用首先在2006年公开的方法的改进方法可获得IPS细胞(Yamanaka,S.et al.,Cell Stem Cell,1:39-49(2007))。例如，在一个实例中，为形成IPS细胞，科学家以皮肤细胞开始，随后通过用反转录病毒将基因插入到细胞DNA中的标准实验室技术对所述皮肤细胞进行了改良。在一个实例中，所插入的基因为Oct4、Sox2、Lif4和c-myc，这些基因已知作为天然调控因子一起作用以使细胞保持在与胚胎干细胞相似的状态。文献已对这些细胞进行了描述。参见，例如，Wernig et al.,PNAS,105:5856-5861(2008);Jaenisch et al.,Cell,132:567-582(2008);Hanna et al.,Cell,133:250-264(2008);和Brambrink et al.,Cell Stem Cell,2:151-159(2008)。这些参考文献以引用的方式纳入以教导IPSC和制备它们的方法。也可通过特定培养条件(暴露于特定试剂)获得这些细胞。

[0138] 术语“分离的”指不与一种或多种细胞结合或者不与在体内与所述一种细胞或多种细胞结合的一种或多种细胞组分结合的一个或多个细胞。“富集群”指需要的细胞相对于体内或原代培养物中一种或多种其他细胞类型的数量上相对增加。

[0139] 然而，本文所用的术语“分离的”不表示仅干细胞的存在情况。而是，术语“分离的”表示细胞从其天然组织环境中取出并以相对所述正常组织环境更高的浓度存在。因此，“分离的”细胞群可进一步包括干细胞以外的细胞类型并可包括其他组织组分。这还可用例如细胞的倍增来表示。细胞可在体外或离体进行10、20、30、40次或更多次的倍增，从而相对其在体内或在原始组织环境(例如骨髓、外周血、脂肪组织等)中的原始数量被富集。

[0140] “MAPC”是“多能成体祖细胞”的首字母缩略词。它是指非胚胎干细胞或非生殖细胞但具有这两种细胞的某些特征的细胞。MAPC可以以许多其他描述来表征，每一个描述在被发现时均赋予所述细胞以新特征。因此，它们可以用这些描述中的一个或多个来表征。第一，它们无需转化(发生肿瘤)而具有在培养物中长期复制的能力并具有正常核型。第二，它

们在分化时可以生成多于一个胚层，例如两个或全部三个胚层(即，内胚层、中胚层和外胚层)，的细胞后代。第三，虽然它们不是胚胎干细胞或生殖细胞，但它们可以表达这些原始细胞类型的标志物，因此MAPC可以表达Oct 3/4(即Oct 3A)、rex-1和rox-1中的一种或多种。它们还可以表达sox-2和SSEA-4中的一种或多种。第四，像干细胞一样，它们可以自我更新，也就是无需转化而具有长期复制能力。这意味着这些细胞可表达端粒酶(即具有端粒酶活性)。因此，以“MAPC”命名的细胞类型可以由通过若干新性质描述该细胞的替代的基本特征来表征。

[0141] MAPC中的术语“成体”是非限制性的。它是指非胚胎体细胞。MAPC核型正常并且在体内不形成畸胎瘤。该首字母缩略词在美国专利No.7,015,037中首次用于描述从骨髓分离的多能细胞。但是，随后发现了具有多能性标志物表达和/或分化潜能的细胞，对于本发明的目的，这些细胞可以等价于这些首次被命名为“MAPC”的细胞。MAPC类型细胞的基本描述在上文本发明的发明内容中提供。

[0142] 术语“MAPC”中涉及的“多能的”是指在分化时产生多于一个(例如全部三个)原始胚层(即内胚层、中胚层和外胚层)的细胞谱系的能力。该术语与文献中的使用不一致。

[0143] MAPC代表比MSC更原始的祖细胞群(Verfaillie,CM.,Trends Cell Biol 12:502-8(2002),Jahagirdar,B.N.,et al.,Exp Hematol,29:543-56(2001);Reyes,M.and CM.Verfaillie,Ann N Y Acad Sci,938:231-233(2001);Jiang,Y.et al.,Exp Hematol,30896-904(2002);和Jiang,Y.et al.,Nature,418:41-9.(2002))。

[0144] 术语“MultiStem®”是基于美国专利No.7,015,037的MAPC的细胞制品的商品名称，即如上所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞。

[0145] MultiStem®可按照本专利申请中公开的细胞培养方法制备，特别是低氧和高血清。

[0146] “非静态培养条件”包括其中液体细胞培养物运动的条件。这可通过可搅动培养基的任何方式来实现。实例包括旋转瓶(搅拌悬浮)、滚瓶、灌流、通气、搅拌或旋转，例如在旋转壁式容器或旋转的细胞培养系统中。

[0147] “可药用载体”是用于本发明中所用细胞的任何可药用介质。所述介质可保持等渗性、细胞代谢、pH等。所述介质与对受试者的体内给药相容，因此可用于细胞递送和治疗。

[0148] 术语“效能”是指细胞实现所需效果的能力。

[0149] 可培养并刺激“原始胚胎生殖细胞”(PG或EG细胞)以产生很多分化程度较低的细胞类型。

[0150] “祖细胞”是在干细胞分化过程中产生的细胞，其具有它们的最终分化子代的特性的一些但非全部。确定的祖细胞例如“心脏祖细胞”可形成细胞谱系，而不形成具体的或终末分化的细胞类型。首字母缩略词“MAPC”中使用的术语“祖”并不将这些细胞限制于具体的细胞谱系。祖细胞可以形成比所述祖细胞分化程度更高的子代细胞。

[0151] 本文使用的术语“减少”是指阻止以及下降。在上下文所述的治疗中，“减少”是阻止或改善一种或多种临床症状。临床症状是如果不予处理将对受试者的生活质量(健康)产生或将产生消极影响的一种(或多种)症状。这还适用于潜在的生物学效应。

[0152] “选择”具有所需水平的效能的细胞可以指鉴别(如通过测定)、分离和扩增细胞。这能够产生具有比分离出所述细胞的亲代细胞群更高效能的细胞群。

[0153] 选择可实现所需效果的细胞包括确定所述细胞是否可实现所需效果的测定，并且还包括获得这些细胞。所述细胞可天然地实现所需要的效果，因为所述细胞没有与可诱导所述效果的试剂一起孵育或暴露于所述试剂。在进行所述测定前，可以不知道所述细胞是否可实现所需要的效果。因为效果可依赖于基因表达和/或分泌，所以还可以在一种或多种可导致所述效果的基因的基础上进行选择。

[0154] 选择可以来自组织中的细胞。例如，在这种情况下，将细胞从所需的组织中分离、在培养物中扩增、对实现所需要的效果进行选择，并对选择的细胞进一步扩增。

[0155] 选择还可以来自离体的细胞，例如培养物中的细胞。在这种情况下，就实现所需要的效果来测定培养物中的所述一个或多个细胞，并且获得的可实现所需要的效果的细胞可以被进一步扩增。

[0156] 还可以就实现所需要效果的能力增强来选择细胞。在这种情况下，从中获得增强细胞的细胞群已经具有所需要的效果。增强的效果意指每种细胞的平均量比亲代细胞群更高。

[0157] 从中选择增强细胞的亲代细胞群可以是大体上同种的(相同细胞类型)。从该细胞群中获得这种增强细胞的一种方式是形成单细胞或细胞池并测定这些细胞或细胞池来获得天然地具有所述效果(相对于用可诱导或增加所述效果的调节剂来处理细胞)的克隆，然后扩增这些天然地增强的细胞。

[0158] 但是，还可用一种或多种试剂与可诱导或增加所述效果的调节剂一起来处理细胞。因此，可以处理大体上同种的细胞群来增强调节。

[0159] 如果所述细胞群不是大体上同种的，那么优选在要处理的亲代细胞群中含有至少100个在其中寻求增强效果的需要的细胞类型，更优选为至少1,000个细胞，还更优选为10,000个细胞。处理之后，这个亚群可以通过公知的细胞选择技术从异种细胞群中回收，如果需要的话可进一步地扩增。

[0160] 因此，效果的所需水平可以是高于给定在前的细胞群的水平。例如，被放入来自组织的原代培养物并通过不是特别设计用来产生所述效果的培养条件扩增和分离的细胞，可以提供亲代细胞群。这样的亲代细胞群可以经过处理来增强每细胞的效果或筛选出细胞群内没有故意处理就表现出更高程度的效果的细胞。然后，可以扩增这些细胞来提供较高(所需)表达的细胞群。

[0161] “自我更新”是指产生复制子代干细胞的能力，所述子代干细胞具有与其来自的亲代细胞相同的分化潜能。本文中使用的类似术语是“增殖”。

[0162] “无血清培养基”是指这样的培养基，其中没有血清，或者，如果有的话，血清组分的水平对细胞生长或变化性没有影响(即实际上是不必要的，例如残留量或微量)。

[0163] “静态培养条件”包括其中液体细胞培养物不动的那些条件。这意指没有施加搅拌或混合所述培养基的外力。

[0164] “干细胞”是指可以进行自我更新(即，子代具有相同的分化潜能)并且也可以产生分化潜能更受限的子代细胞的细胞。在本发明的上下文中，干细胞还可以涵盖分化程度更高的细胞，其已经通过例如以下方式去分化：通过核转移、通过与更原始的干细胞融合、通过导入特定的转录因子或者通过在特定条件下培养。参见，例如，Wilmut et al.,Nature,385:810-813(1997);Ying et al.,Nature,416:545-548(2002);Guan et al.,Nature,

440:1199-1203(2006);Takahashi et al.,Cell,126:663-676(2006);Okita et al.,Nature,448:313-317(2007);和Takahashi et al.,Cell,131:861-872(2007)。

[0165] 去分化还可以通过给予一些化合物或在体内或体外暴露于可以引起去分化的物理环境而引起。干细胞还可以来自异常组织,例如畸胎癌和一些其他来源,例如胚状体(尽管这些可被认为是胚胎干细胞,因为它们来自胚胎组织,尽管不是直接来自于内细胞团)。干细胞还可以通过将与干细胞功能相关的基因导入非干细胞例如诱导的多能干细胞中而产生。

[0166] "受试者"为脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括但不限于人、农畜、运动动物(sport animals)和宠物。需要通过本发明的方法治疗的受试者包括患有由于身体或疾病相关损伤造成的功能缺失的受试者。

[0167] 术语"治疗有效量"是指被确定可在哺乳动物中产生任何治疗反应的量。例如,有效量的治疗细胞或细胞相关的试剂可以延长患者的存活力,和/或抑制明显的临床症状。在本文使用的术语的含义范围内,治疗有效的治疗包括改善患者的生活质量的治疗,即使它们没有改善疾病结果本身。这样的治疗有效量可由本领域普通技术人员通过对受试者群体的常规应用例如在临床试验和临床前试验中确定。因此,"治疗"是指送递这样的量。

[0168] 本发明中广泛使用术语"治疗("Treat"、"treating"或"treatment")",其中包括防止、改善、抑制或者治愈缺陷、机能障碍、疾病或其他有害的过程,包括干扰治疗的和/或由治疗导致的那些。

[0169] "验证"是指确认。确认细胞是具有所需效能的表达子。然后,这使得可以使用具有合理的期望效能的细胞(用于治疗、入细胞库、药物筛选等)。因此,进行验证是指确认,原先被发现具有/确立具有所需要效果的细胞实际上保持所述能力。因此,验证是涉及原先确定和后续确定的两事件过程的确认事件。此处第二个事件是指"验证"。

[0170] 形成初始集合体

[0171] 同样来自本发明人的WO 2009/092092公开了,非胚胎干细胞可成功地形成集合体,其中所述细胞可保持单个非胚胎干细胞的未分化表型。因此,所述集合体能够产生具有分化程度更高的表型的子代。该申请以引用的方式纳入本文以教导从单个细胞形成集合体。

[0172] 有用的细胞包括未被转化的或非致瘤性的并可具有正常核型的细胞。例如,已知一些细胞例如MAPC在体内不形成畸胎瘤并且在培养中具有正常核型。

[0173] 可通过使用任何用于非贴壁生长的方法,例如本领域已知方法的任一种来形成所述集合体。这些包括悬滴法(Kurosawa and Hopfl,在下文引用)、强制聚集方法(离心)(Ng,在下文引用)、细胞被培养在非贴壁塑料上的方法、悬浮培养(静态或搅拌)、生物反应器扩增平台和非附着或特殊的涂层,例如温度敏感的基于聚合物的培养板、控制集落大小的微接触印刷的孔以及微流体装置。

[0174] 很多不同的基础培养基是本领域中已知的。这些培养基可以加入或不加入血清(或具有变化的血清浓度,例如0.5%-20%或更多)使用。当无血清或血清减少时,普通技术人员会了解可使用生长因子来补充所述基础培养基,包括但不限于EGF和/或PDGF。氧气浓度可从大气浓度减少至范围为1-5、5-10、10-15、15-20%以及中间数值。

[0175] 所述干细胞可来自多种组织,例如骨髓、胎盘、外周血、脐带血和组织、皮肤和脂

肪。本申请中例示了文献中称为“MAPC”的细胞。但是本发明还涵盖任何可形成多于一种胚胎胚层的细胞类型的非胚胎干细胞。参见，例如U.S.7,311,905、2003/0059414、2002/0164794，其均以引用的方式纳入本文以教导这些细胞以及制备它们的方法。

[0176] 另外，分化程度较低的干细胞可来自多种操作，例如，通过在分化细胞中转染并表达特定基因来对未分化状态进行基因重编程、将体细胞核转移到产生对应于比所述体细胞分化程度更低的表型的基因表达的环境、在足以维持多能性的培养基和培养条件中培养(例如，“MAPC培养基”和扩增方案)、通过将体细胞与胚胎干细胞融合进行核重编程、培养物诱导的重编程-细胞外植，以及用卵母细胞或多能细胞的细胞提取物处理体细胞核(Hochedlinger and Jaenisch,Nature441:1061-1067(2006))。

[0177] 本发明涉及来自任何物种的干细胞，特别是涉及哺乳动物物种，更特别涉及人。在物种内，可使用(例如将细胞给予受试者)同种异体的细胞。跨物种时，可使用异种细胞。在受试者内，细胞可以是自体的。

[0178] 对于本发明，集合体被定义为至少10个细胞。但是范围包括，不过大从而内部细胞坏死的集合体。这可以包括100-300μ的集合体以及中间的数值，例如150-250μ。技术人员会认识到所述范围内任何可用的数值。对临床应用来说集合体的可用数值为大于50。细胞数可以有变化，范围从数百至数万或更多，例如100-1000(约200、300、400、500、600、700、800、900个细胞)、1000-10,000、(约2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000个细胞)、10,000-50,000(约20,000、30,000、40,000个细胞)或更多。

[0179] 在培养中所述集合体的密度范围可以为约10^4-10^8个细胞/ml。因此，也涵盖了约10^5、10^6和10^7的密度(每ml)。还涵盖了中间的范围，例如约2×10^4、3×10^4、4×10^4、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7。还涵盖了这些密度内的其他子范围。

[0180] 在非静态条件下形成的集合体中的平均细胞数可以为宽范围，例如从约1,000至50,000或更大(每集合体)。还涵盖了中间的范围，例如约10,000、20,000、30,000和40,000。还涵盖了这些范围内的子范围，例如2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000-20,000、20,000-30,000、30,000-40,000、40,000-50,000，以及这些范围之间的子范围。

[0181] 在起始集合体(即用于接种所述培养物的集合体)中的平均细胞数可以为宽范围，例如从约10个细胞至约25,000个细胞。还涵盖了中间的范围，例如10-100、200、300、400、500、600、700、800、900和1,000-10,000、10,000-15,000、15,000-20,000、20,000-25,000，以及这些数值之间的子范围，例如2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、11,000、12,000、13,000、14,000(即以1000的增量增加到25,000)或甚至这些范围之间的数值。

[0182] 因此，每集合体中细胞数的平均倍数增加包括2×(每集合体25,000→50,000个细胞)至5,000×(10→50,000)的范围。所述增加倍数取决于初始集合体和扩增后的集合体中的细胞数。可以从以上给定的任何数值计算增加倍数。

[0183] 在具体实施方案中，起始集合体平均含有1,000-5,000个细胞。

[0184] 本申请中提供的实施例使用了已经被命名为多能成体祖细胞(“MAPC”)的细胞。但

是本发明涉及不是胚胎细胞但可以分化为多于一种胚层(例如2种或3种)的所有类型和/或表达多能性标志物的任何及所有干细胞。

[0185] 在集合体形成中的另一个参数是用于形成集合体的分离的干细胞群的纯度。因此,在本发明中,集合体可以由存在于也含有其他细胞的群中的所需干细胞形成。例如,骨髓细胞包括混合的细胞群,其可被纯化至足以产生所需效果的程度。本领域技术人员可以使用多种公知的方法例如荧光激活细胞分选(FACS)来容易地确定群中所需细胞的百分数。还可根据群内的基因表达谱来确定给定的干细胞的纯度。

[0186] 包括给定干细胞的群的纯度范围为约50-55%、55-60%和65-70%。其他范围包括约70-75%、75-80%、80-85%的纯度。其他范围还包括约85-90%、90-95%和95-100%的纯度。但是,还可以使用更低纯度的群,例如约25-30%、30-35%、35-40%、40-45%和45-50%。

[0187] 在集合体中,所述非胚胎细胞例如MAPC可以是基本上同种的,或被发现达不到基本上同种的形式。因此,集合体的纯度可以如上述变化。此外,当形成集合体时可以混有其他细胞类型。

[0188] 在将所述集合体置于分化条件中以产生若干本申请论述的分化细胞类型的方法中,这些条件中的很多——即使不是大多数——是本领域普通技术人员可以获得的。参见,例如Mays et al.,Expert Opinion Biol Ther2:173-184(2007)以及其中提到的分化方案;肝细胞(J Clin Invest 109:1291-302);造血(hematopoietic)(J Exp Med204:129-39)、平滑肌(J Clin Invest116:3139-3149(2006))。这些分化条件以引用的方式纳入本文。很多分化条件在U.S.7,015,037和Mays et al.(上文)中,因为这些方法将其以引用的方式纳入本文。

[0189] 形成所述集合体的一个方案是使用DMEM-低葡萄糖、MCDB、2%胎牛血清、PDGF-BB、EGF、LIF、BSA、胰岛素-硒-转铁蛋白(ITS)、亚油酸和脂质混合物以及5%氧气。可优选使用可增强oct3/4转录因子表达的条件,例如在2D(贴壁)培养物中MAPC的表达水平下。

[0190] 初始聚集方法

[0191] 至少有两种方法形成所述集合体:(a)悬滴(基于表面张力的方法);(b)强制聚集(以1500rpm离心4分钟将细胞物理地离心到96孔超低附着U型底培养板(Corning)的底部)。虽然两种方法都可用于形成集合体,但是要产生大量集合体悬滴法是更经济的。其他方式包括搅拌悬浮或在无附着的培养板/瓶中生长。形成受控制大小的集合体的其他可能方法可以是例如微接触印刷方法。

[0192] 这些方法在如下引文中说明,所述引文以引用的方式纳入本文用于教导多种无附着细胞培养方法。

[0193] Dang et al.,"Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems" Biotechnology and Bioengineering78:442-453(2002).

[0194] Konno et al.,"Formation of embryoid bodies by mouse embryonic stem cells on plastic surfaces"Journal of Bioscience and Bioengineering 100:88-93(2005).

[0195] Ng et al.,"Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust,reproducible hematopoietic

differentiation.Commentary"Blood106:1601-1603(2005)[强制聚集方法]。

[0196] Kurosawa et al.,"A simple method for forming embryoid body from mouse embryonic stem cells"Journal of Bioscience and Bioengineering96:409-411(2003).

[0197] Magyar et al.,"Mass production of embryoid bodies in microbeads"Annals of the New York Academy of Sciences944:135-143(2001).[可放大生产的微珠形式的细胞集合体]。

[0198] Hopfl et al.,"Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies"Methods Mol Biol254:79-98(2004)[悬滴法]。

[0199] Cameron et al.,"Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation"Biotechnol Bioeng94:938-948(2006)[搅拌-悬浮培养系统]。

[0200] Wang et al.,"Scalable producing embryoid bodies by rotary cell culture system and constructing engineered cardiac tissue with ES-derived cardiomyocytes in vitro"Biotechnol Prog22:811-818(2006)[旋转悬浮系统]。

[0201] Yang et al.,Biomacromolecules8,9,2746-2752(2007)[使用温度敏感的水凝胶]。

[0202] Torisawa et al.,"Lab on a Chip"7:770-776(2007)[使用用于有效大小EB形成的微流体]。

[0203] 可以用大于100的起始(单个的)细胞数形成所述集合体。已在历时4天的悬滴/强制聚集方法中使用最多4000个细胞形成单个的集合体。从1000个细胞起始,所述集合体在4天的悬滴培养后的细胞数大约为每集合体6600个细胞(通过台盼蓝排除法计数)。因此,可用的起始范围为每集合体100-4000,最佳为400-2000。

[0204] 干细胞

[0205] 本发明可以优选地使用脊椎动物物种的干细胞进行,所述脊椎动物物种例如人、非人灵长类、驯养动物、家畜和其他非人哺乳动物。

[0206] 非胚胎的

[0207] 据报道能够分化成为超过一种胚胎胚层的细胞类型的非胚胎细胞包括但不限于来自脐带血的细胞(参见美国公布文本No.2002/0164794)、来自胎盘的细胞(参见美国公布文本No.2003/0181269)、来自脐带基质的细胞(Mitchell et al.,Stem Cells,21:50-60,2003)、来自小胚胎样干细胞的细胞(Kucia et al.,J Physiol Pharmaco,57Suppl5:5-18,2006)、来自羊水干细胞的细胞(Atala,A.,JTissue Regen Med1:83-96,2007)、来自皮肤来源的前体的细胞(Toma et al.,Nat Cell Biol3:778-784,2001)、来自脂肪组织的细胞(U.S.2005/0153442)、来自胃肠干细胞、表皮干细胞和肝干细胞(其也被称为“卵圆细胞”)的细胞(Potten et al.,Trans R Soc Lond B Biol Sci 353:821-830(1998);Watt,F.,Trans R Soc Lond B Biol Sci353:831(1997);Alison et al.,Hepatology29:678-683(1998))、以及来自骨髓的细胞(参见美国公布文本No.2003/0059414和2006/0147246),其各自以引用的方式纳入本文以教导这些细胞。

[0208] 重编程体细胞的方法

[0209] 已经使用了一些不同的方法(例如核移植、细胞融合和培养诱导的重编程)来诱导分化的细胞转化为胚胎状态。以下引用的参考文献以引用的方式纳入本文以教导怎样制备这些细胞并描述它们。

[0210] 核转移包括将体细胞核注射进入去核卵母细胞,当所述卵母细胞被转移进入代理母亲中时,可以形成克隆("生殖性克隆"),或者当所述卵母细胞在培养物中外植时,可以形成遗传匹配的胚胎干(ES)细胞("体细胞核转移",SCNT)。体细胞与ES细胞的细胞融合致使产生显示多能ES细胞的全部特性的杂合体。培养物中的体细胞的外植可选择用于可以是多能(pluripotent or multipotent)的无限增殖细胞系。目前,精原干细胞是来源自出生后动物的多能细胞的唯一来源。用规定的因子转导体细胞可以启动重编程至多能状态。对这些试验方法有大量综述(Hochedlinger and Jaenisch,Nature441:1061-1067(2006)和Yamanaka,S.,Cell Stem Cell1:39-49(2007))。

[0211] 核转移

[0212] 核移植(NT),也被称作体细胞核转移(SCNT),是指将来自供体体细胞的核导入去核卵母细胞以产生克隆动物(Wilmut et al.,Nature 385:810-813(1997))。通过NT产生活的动物证明了体细胞的表观遗传状态,包括终末分化的细胞可被重编程至胚胎状态。

[0213] 体细胞和胚胎干细胞的融合

[0214] 将体细胞核表观遗传重编程至未分化状态,已经被胚胎细胞与体细胞的融合证明。多种体细胞与胚胎癌细胞(Solter,D.,Nat Rev Genet,7:319-327(2006))、胚胎生殖细胞(EG)或ES细胞(Zwaka and Thomson,Development,132:227-233(2005))之间的杂合体有很多与亲本胚胎细胞相同的特性,表明多能表型在这样的融合产物中是主要的。对于小鼠(Tada et al.,Curr Biol,11:1553-1558(2001)),人ES细胞具有在融合之后重编程体细胞核的潜能(Cowan et al.,Science,309:1369-1373(2005);Yu et al.,Science,318:1917-1920(2006))。沉默的多能性标志物例如oct4可以被激活(Do and Scholer,Stem Cells22:941-949(2004))。当与神经干细胞融合时,在ES细胞中Nanog的强制过表达可促进多能性(Silva et al.,Nature441:997-1001(2006))。

[0215] 培养物诱导的重编程

[0216] 已经从胚胎源得到了多能细胞,所述胚胎源例如卵裂球和胚泡的内细胞团(ICM)(ES细胞)、上胚层(EpiSC细胞)、原始生殖细胞(EG细胞)和出生后精原干细胞("maGSCsm","ES样"细胞)。以下的多能细胞,与它们的供体细胞/组织一起,描述如下:单性生殖ES细胞(parthogenetic ES cell)来自鼠卵母细胞(Narasimha et al.,Curr Biol,7:881-884(1997));胚胎干细胞来自卵裂球(Wakayama et al.,Stem Cells,25:986-993(2007));内细胞团细胞(来源不适用)(Eggan et al.,Nature,428:44-49(2004));胚胎生殖细胞和胚胎癌细胞来自原始生殖细胞(Matsui et al.,Cell,70:841-847(1992));GMCS、maSSC和MASC来自精原干细胞(Guan et al.,Nature,440:1199-1203(2006);Kanatsu-Shinohara et al.,Cell,119:1001-1012(2004);和Seandel et al.,Nature,449:346-350(2007));EpiSC细胞来自上胚层(Brons et al.,Nature,448:191-195(2007);Tesar et al.,Nature,448:196-199(2007));单性生殖ES细胞来自人卵母细胞(Cibelli et al.,Science,295L819(2002);Revazova et al.,Cloning Stem Cells,9:432-449(2007));人ES细胞来自人胚泡(Thomson et al.,Science,282:1145-1147(1998));MAPC来自骨髓

(Jiang et al.,Nature,418:41-49(2002);Phinney and Prockop,Stem Cells,25:2896-2902(2007));脐带血细胞(来自脐带血)(van de Ven et al.,Exp Hematol,35:1753-1765(2007));神经球(neurosphere)衍生的细胞来自神经细胞(Clarke et al.,Science,288:1660-1663(2000))。来自生殖细胞谱系的供体细胞(例如PGC或精原细胞干细胞)已知在体外是单能性的,但是已证明多能ES样细胞(Kanatsu-Shinohara et al.,Cell,119:1001-1012(2004))或maGSC(Guan et al.,Nature,440:1199-1203(2006))在体外长时间培养后可被分离。尽管大部分这些多能细胞类型能够在体外分化和形成畸胎瘤,但依据更严格的标准,仅ES、EG、EC和精原干细胞衍生的maGCS或ES样细胞是多能的,因为它们能够形成出生后嵌合体并且成为生殖种系。最近,多能成体精原干细胞(MASC)从成体小鼠的睾丸精原干细胞中得到,并且这些细胞具有与ES细胞不同(Seandel et al.,Nature,449:346-350(2007))但是与EpiSC细胞类似的表达谱,所述EpiSC细胞来自植入后小鼠胚胎的上胚层(Brons et al.,Nature,448:191-195(2007);Tesar et al.,Nature,448:196-199(2007))。

[0217] 通过规定的转录因子进行重编程

[0218] 体细胞可被重编程至ES样状态(Takahashi and Yamanaka,Cell,126:663-676(2006))。通过转导oct4、sox2、c-myc和Klf4,小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)和成体成纤维细胞被编程至多能ES样细胞。细胞被称为iPS细胞(诱导的多能干细胞)。同时遗传实验已经确定Oct4和Sox2是多能性必需的(Chambers and Smith,Oncogene23:7150-7160(2004);Ivanona et al.,Nature442:5330538(2006);Masui et al.,Nat CellBiol9:625-635(2007)),c-myc和Klf4可以是非必须的(Nakagawa et al.,Nat Biotechnol26:191-106(2008);Werning et al.,Nature 448:318-324(2008);Yu et al.,Science318:1917-1920(2007))。

[0219] MAPC

[0220] 本发明的示例性细胞被命名为"MAPC"。MAPC是"多能成体祖细胞"(非ES、非EG、非生殖细胞)的首字母缩略词,其具有分化为全部三个原始胚层(外胚层、中胚层和内胚层)的细胞类型的能力。在ES细胞中发现的基因也发现于MAPC中(例如端粒酶、Oct3/4、rex-1、rox-1、sox-2)。Oct3/4(在人中是Oct3A)似乎是ES和生殖细胞特有的。MAPC代表比MSC更原始的祖细胞群,并显示出涵盖上皮谱系、内皮谱系、神经谱系、生肌谱系、造血谱系、成骨谱系、肝原性谱系、软骨形成谱系和脂肪形成谱系的分化能力(Verfaillie,CM.,Trends Cell Biol 12:502-8,2002,Jahagirdar et al.,Exp Hematol29:543-56,2001;Reyes and Verfaillie,Ann N Y Acad Sci938:231-233,2001;Jiang et al.,Exp Hematol30896-904,2002;和Jiang et al.,Nature418:41-9,2002)。因此,MAPC模仿了ES细胞的广泛生物可塑性特征,同时保持了使非胚胎干细胞有吸引力的其他特征(例如正常核型并且不形成畸胎瘤)。

[0221] 人MAPC记载于美国专利7,015,037和申请No.10/467,963中,因为它们对MAPC的描述将它们的内容以引用的方式纳入本文。已经在其他哺乳动物中鉴定了MAPC。MAPC可从多个来源分离,所述来源包括但不限于骨髓、胎盘、脐带和脐带血、肌肉、脑、肝脏、脊髓、血液和皮肤。

[0222] MAPC的分离和生长

[0223] 在形成集合体之前，可以使用本文和美国专利7,015,037公开的方法分离并培养MAPC，因为这些方法将所述专利以引用的方式纳入本文。

[0224] MAPC分离方法是本领域中已知的。参见，例如，美国专利7,015,037，这些方法连同MAPC的表征(表型)以引用的方式纳入本文。MAPC可从多个源分离，所述源包括但不限于骨髓、胎盘、脐带和脐带血、肌肉、脑、肝脏、脊髓、血液或皮肤。因此，可能获得骨髓抽吸物、脑或肝脏活检样品和其他器官，并且使用本领域技术人员知晓的阳性或阴性选择技术，其依赖于这些细胞表达(或者不表达)的基因(例如，通过功能性或形态学测定例如上文引用的申请中公开的那些，所述申请以引用的方式纳入本文)分离所述细胞。

[0225] MAPC还可以通过在Breyer et al.,Experimental Hematology,34:1596-1601(2006)和Subramanian et al.,Cellular Programming and Reprogramming:Methods and Protocols;S.Ding(ed.),Methods in Molecular Biology,636:55-78(2010)中描述的改进方法来获得，这些方法以引用的方式纳入本文。

[0226] 美国专利7,015,037中描述的来自人骨髓的MAPC

[0227] MAPC不表达共有的白细胞抗原CD45或成红细胞特异的血型糖蛋白-A(Gly-A)。将细胞的混合群进行Ficoll Hypaque分离。然后，以使用抗CD45的抗体和抗Gly-A的抗体的阴性选择对细胞进行处理，耗尽$CD45^+$和$Gly\text{-}A^+$细胞的群，然后回收剩余的约0.1%的骨髓单核细胞。还可将细胞铺板于纤连蛋白包被的孔中，并且如下文所述培养2-4周以耗尽$CD45^+$和$Gly\text{-}A^+$细胞。在贴壁骨髓细胞(adherent bone marrow cell)的培养物中，很多贴壁基质细胞在细胞倍增约30次时发生复制性衰老，更同质的细胞群继续扩增并且保持长的端粒。

[0228] 或者，可以通过细胞特异性标志物的组合使用阳性选择来分离细胞。阳性和阴性选择技术都是本领域技术人员可以得到的，并且本领域中可得到很多适于阴性选择目的的单克隆和多克隆抗体(参见，例如，Leukocyte Typing V,Schlossman,et al.,Eds.(1995)Oxford University Press)，其可从许多来源市购得到。

[0229] 从细胞群混合物中分离哺乳细胞的技术也已经由Schwartz et al.在美国专利5,759,793中(磁性分离)、Basch et al.,1983(免疫亲和层析)和Wysocki and Sato,1978(荧光激活的细胞分选)记载。

[0230] 细胞可在低血清或无血清培养基中培养。用于培养物MAPC的无血清培养基记载于美国专利7,015,037中。通常使用的生长因子包括但不限于血小板衍生的生长因子和表皮生长因子。参见，例如，美国专利No.7,169,610、7,109,032、7,037,721、6,617,161、6,617,159、6,372,210、6,224,860、6,037,174、5,908,782、5,766,951、5,397,706和4,657,866；全部以引用的方式纳入本文用于教导在无血清培养基中培养细胞。

[0231] 另外的培养方法

[0232] 在另外的实验中，培养MAPC的密度可以是从约100个细胞/cm^2或约150个细胞/cm^2至约10,000个细胞/cm^2变化，包括约200个细胞/cm^2至约1500个细胞/cm^2至约2000个细胞/cm^2。所述密度可随种类的不同而变化。此外，最佳密度可依赖于培养条件和细胞来源而变化。本领域技术人员能够确定对于给定培养条件和细胞的组的最佳密度。

[0233] 同样，在培养物中，在MAPC的分离、生长和分化过程中的任何时间都可以使用低于约10%，包括约1-5%，尤其是3-5%的有效大气氧浓度。

[0234] 可在多种血清浓度下(例如约2-20%)培养细胞。可以使用胎牛血清。更高的血清浓

度可以与更低的氧张力结合使用，例如约15-20%。不必在贴壁至培养皿之前选择细胞。例如，在Ficoll梯度离心之后，将细胞以例如250,000-500,000/cm^2直接铺板。可以挑出贴壁集落，可以将其合并并且扩增。

[0235] 在一个实施方案中，在实施例的实验方法中使用的高血清(约15-20%)和低氧(约3-5%)条件被用于细胞培养物。具体地，将来自集落的贴壁细胞以约1700-2300个细胞/cm^2的密度在18%血清和3%氧下(具有PDGF和EGF)中铺板并传代。

[0236] 在特异针对MAPC的实施方案中，补充物是允许MAPC保持分化为多于一个胚胎谱系例如所有三个谱系的细胞类型的能力的细胞因子或组分。这可以通过未分化状态的特定标志物例如Oct 3/4(Oct 3A)和/或高扩增能力标志物例如端粒酶的表达来指示。

[0237] 从分化细胞的未分化对应物中鉴定并分离所述分化细胞的方法可以通过本领域公知的方法进行。可以通过在分化细胞数目远远超过未分化细胞的条件下选择性地培养细胞来鉴定已使用本发明的方法诱导至分化的细胞。类似地，可以通过分化细胞的形态改变以及在其未分化对应物中不存在的特征(例如细胞大小和细胞内细胞器分布的复杂度)来鉴定分化细胞。还涵盖了，通过特定的细胞表面标志物例如细胞受体和跨膜蛋白的表达来鉴定分化细胞的方法。针对这些细胞表面标志物的单克隆抗体可被用于鉴定分化细胞。检测这些细胞可通过荧光激活的细胞分选(FACS)和酶联免疫吸附测定(ELISA)来实现。从特定基因转录上调的观点看，分化细胞经常显示出与未分化细胞不同的基因表达水平。也可使用反转录聚合酶链式反应或RT-PCR来监控对分化响应的基因表达的改变。使用微阵列技术的全基因组分析也可被用于鉴定分化细胞。

[0238] 因此，一旦鉴定了分化细胞，如果必要，就可以将其从其未分化对应物中被分离。以上文详述的鉴定方法还提供了分离方法，例如FACS、优选的细胞培养方法、ELISA、磁珠及其组合。本发明的一个实施方案涵盖了基于细胞表面抗原表达使用FACS来鉴定和分离细胞。

[0239] 药物制剂

[0240] U.S.7,015,037以引用的方式纳入本文用于教导药物制剂。在一些实施方案中，所述细胞群存在于组合物中，所述组合物被改造为适于递送，也就是生理学相容的。

[0241] 在一些实施方案中，用于给予受试者的细胞(或条件培养基)的纯度是约100%(基本同质)。在其他实施方案中，纯度是95%至100%。在一些实施方案中，纯度是85%至95%。特别地，对于与其他细胞的混合物的情况，所述百分比可以是约10%-15%、15%-20%、20%-25%、25%-30%、30%-35%、35%-40%、40%-45%、45%-50%、60%-70%、70%-80%、80%-90%或90%-95%。或者，分离/纯度可以细胞倍增的方式表示，其中所述细胞已经经历了例如10-20、20-30、30-40、40-50或更多次的细胞倍增。

[0242] 对于给定应用，用于给予所述细胞的制剂的选择将依赖于多种因素。其中主要的因素是受试者的种类；待治疗的病症的性质，它的状态和在所述受试者中的分布；所给予的其他疗法和试剂的性质；给药的最佳途径；经所述途径的存活力；给药方案和对于本领域技术人员来说明显的其他因素。例如，合适载体和其他添加剂的选择会依赖于给药的确切路径和具体剂型的性质。

[0243] 细胞/培养基的水性悬液的最终制剂一般包括将所述悬液的离子强度调节至等渗(即，约0.1至0.2)并且调节至生理pH(即，约pH6.8至7.5)。最终制剂一般还会包含流体润滑

剂。

[0244] 在一些实施方案中，细胞/培养基被配制为单位剂量的可注射形式的制剂，所述的可注射形式例如溶液剂、悬液剂或乳剂。适于注射细胞/培养基的药物制剂一般是无菌的水性溶液和分散液。用于可注射制剂的载体可以是包含例如以下物质的溶剂或分散介质：水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇（例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等）及其合适的混合物。

[0245] 本领域技术人员可以容易地确定本发明方法中给予的组合物中的细胞和任选的添加剂、赋形物和/或载体的量。一般地，任意添加剂（除所述细胞之外）的存在量为在溶液中（例如在磷酸盐缓冲盐水中）0.001至50wt%。活性成分以微克至毫克的量级存在，例如为约0.0001至约5wt%，优选约0.0001至约1wt%，最优选为约0.0001至约0.05wt%或者约0.001至约20wt%，优选约0.01至约10wt%，最优选为约0.05至5wt%。

[0246] 确定剂量

[0247] 组合物可以分剂量并通过医药和兽医领域技术人员公知的技术来给予，给予时应考虑一些因素例如具体患者的年龄、性别、体重和病症，以及将要给予的制剂（例如固体对比液体）。用于人或其他哺乳动物的剂量无需过度实验即可由本领域技术人员根据本公开内容、本文引用的文献和本领域中的知识确定。

[0248] 根据本发明的各个实施方案，适合使用的细胞的剂量会依赖于许多因素。对于不同的情况其可以显著地变化。确定主要和辅助疗法所给予的最佳剂量的参数一般会包括以下中的一些或全部：待治疗的疾病及其阶段；受试者的种类、其健康情况、性别、年龄、体重和代谢速率；受试者的免疫活性；正给予的其他治疗法；和根据所述受试者的病史或基因型预测的可能并发症。所述参数还包括：所述细胞是否是同源的、自体同源的、同种异体的或者异种的；它们的效能（具体活性）；所述细胞若要有效则必须靶向的位点和/或分布；以及所述位点的特性例如细胞的可及性（accessibility）和/或细胞的植入。其他参数包括与其他因子（例如生长因子和细胞因子）的共给予。给定情况的最佳剂量还将考虑制备所述细胞的方式，给予所述细胞的方式，以及所述细胞在给药之后在所述靶位点处集中（localize）的程度。最终，确定最佳剂量将必需提供这样的有效剂量，即该有效剂量既不在最大有益效果的阈值之下，也不在与所述剂量相关的有害效果超过剂量增加带来的优势的阈值之上。

[0249] 对于一些实施方案，细胞的最佳剂量可以在用于自体同源单核骨髓移植的剂量范围内。对于完全纯的细胞制品，多个实施方案中的最佳剂量的范围是每次给药10^4至10^8个细胞/kg受体体重。在一些实施方案中，每次给药的最佳剂量为10^5至10^7个细胞/kg。在很多实施方案中，每次给药的最佳剂量为5×10^5至5×10^6个细胞/kg。作为参考，前述的较高剂量类似于自体同源单核细胞骨髓移植中使用的有核细胞的剂量。一些较低的剂量类似于自体同源单核骨髓移植中使用的$CD34^+$细胞数目/kg。

[0250] 应理解，可以一次全部地、部分地或在一段时间内连续地递送单剂量。整个剂量还可被递送至单个位置或分部分地扩散到几个位置。

[0251] 在多个实施方案中，可以以初始剂量给予细胞，之后通过进一步给药来维持。初始可用一种方法给予细胞，之后通过相同的方法或者一种或多种不同的方法给予。可通过所述细胞的持续给药来维持所述水平。多个实施方案通过静脉注射来初始给予所述细胞和/或在所述受试者中维持其水平。在多个实施方案中，根据患者的病症和其他因素（在本文他处描述）可使用其他形式的给药。

[0252] 应注意，通常治疗人受试者的时间比治疗实验动物更长；但是，治疗时间长度通常与所述疾病过程的长度和治疗有效性成比例。本领域技术人员会考虑到，可使用其他的在人和/或动物例如大鼠、小鼠、非人灵长类等中进行的操作的结果，来确定对人适合的剂量。基于这些考虑并且考虑到由本公开和现有技术提供的指导，技术人员无需过度实验即可作出这样的确定。

[0253] 用于初次给予和进一步给药或用于依次给予的合适方案可以全部相同或可以变化。合适的方案可以由本领域技术人员根据本公开内容、本文引用的文献和本领域中的知识确定。

[0254] 治疗的剂量、频率和持续时间可以依赖于很多因素，包括疾病的性质、受试者以及可能给予的其他治疗。因此，可以使用多种方案来给予所述细胞/培养基。

[0255] 在某些实施方案中，细胞以一次剂量被给予受试者。在其他实施方案中，细胞以系列的两次或更多次的剂量被连续地给予受试者。在某些其他实施方案中，细胞以一次剂量、两次剂量和/或多于两次的剂量被给予，所述剂量可以是相同或不同的，并且在给予它们的中间可以有相等或不等的间隔。

[0256] 细胞可在很宽的时间范围内以多种频率给予。在某些实施方案中，细胞在少于一天的时间内给予。在其他实施方案中，细胞在两天、三天、四天、五天或六天内给予。在某些实施方案中，细胞在数周内以每周一次或多次给予。在某些实施方案中，细胞在一个月到几个月的若干周内给予。在多个实施方案中，细胞在数月内给予。在其他实施方案中，细胞在一年或多年内给予。一般地，治疗的时间长度会与所述疾病过程的长度、实行的治疗的效力以及接受治疗的受试者的病症和反应成比例。

[0257] 用途

[0258] 可用的细胞为集合体形式或来自所述集合体的细胞。可通过聚集方法产生大量的细胞，但是可将要进一步使用的细胞取出，例如从集合体解聚或分散。因此，例如，药物组合物可以包括集合体形式的细胞或来自所述集合体的细胞(例如通过分散)。同样地，分化因子可被应用于所述集合体形式的细胞或应用于来自所述集合体的细胞。因此，可以用通过将分化条件应用于所述集合体或来自所述集合体的细胞而形成的分化细胞来制备药物组合物。进一步地，以下描述的临床用途涉及所述未分化集合体和来自所述集合体的未分化细胞以及所述集合体的分化子代和来自所述集合体的细胞的分化子代的体内用途。如其分化子代一样，未分化细胞是有用的，因为它们可以在体内产生这些子代。(即使当未分化细胞不分化时，它们也可用于其他有益目的，例如血管生成、免疫调节、细胞形成、营养等)。

[0259] 所述聚集的细胞或来自所述集合体的细胞可具有被诱导以分化形成中胚层、神经外胚层和内胚层起源的至少一种分化细胞类型的能力。例如，所述细胞可具有被诱导以分化形成成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、内皮细胞、上皮细胞、造血细胞、神经胶质细胞、神经元或少突胶质细胞类型中的至少一种细胞的能力。

[0260] 本发明还提供从上述细胞获得的分化细胞，其中所述子代细胞可以是骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、内皮细胞、上皮细胞、内分泌细胞、外分泌细胞、造血细胞、神经胶质细胞、神经元或少突胶质细胞。所述分化子代细胞可以是皮肤上皮细胞、肝上皮细胞、胰上皮细胞、胰内分泌细胞或胰岛细

胞、胰外分泌细胞、肠上皮细胞、肾上皮细胞或表皮相关结构。

[0261] 所述细胞或其分化子代可被用于纠正遗传疾病、退行性疾病、心血管疾病、代谢贮积病(metabolic storage disease)、神经疾病或癌症疾病过程。它们可被用于产生牙龈样材料以治疗牙周病。它们可被用于开发可被用于皮肤移植和整形手术的细胞衍生的皮肤上皮组织。它们可被用于增强肌肉,例如在阴茎或心脏中。它们可被用于产生离体血液用于治疗用途,或用于产生人造血细胞和/或产前或产后的动物血液以用于人。它们可被用作治疗药物以帮助,例如,患者从癌症治疗、自身免疫性疾病的治疗的化学治疗或放射治疗中的恢复,以在所述接受者中诱导耐受性。它们可被用于治疗AIDS或其他传染病。

[0262] 神经视网膜细胞可被用于治疗失明,所述失明由其中包括但不限于神经视网膜疾病的疾病导致,所述神经视网膜疾病由其中包括但不限于黄斑变性、糖尿病视网膜病变、青光眼、视网膜色素变性的疾病导致。

[0263] 所述细胞或来自所述细胞的心肌细胞可被用于治疗心脏病,所述心脏病包括但不限于心肌炎、心肌病、心力衰竭、由心脏病发作导致的损伤、高血压、动脉粥样硬化和心脏瓣膜功能障碍。它们还可被用于治疗涉及CNS缺损或损伤的疾病。进一步地,所述干细胞或其神经分化的子代细胞可被用于治疗涉及神经缺损或变性的疾病,所述疾病包括但不限于中风、阿尔茨海默病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、AIDS相关的痴呆、脊髓损伤以及影响脑和其他神经组织的代谢病。

[0264] 细胞或其分化子代,例如基质细胞可被用于在体内或体外支持其他细胞类型的生长和分化,所述其他细胞类型包括但不限于造血细胞、胰岛细胞或B细胞、肝细胞等。所述细胞或分化的软骨子代细胞可被用于治疗关节或软骨疾病,包括但不限于软骨撕裂、软骨变薄和骨关节炎。此外,所述细胞或其分化的成骨细胞子代可被用于改善对骨有有害效果的过程,所述过程包括但不限于骨折、不愈合骨折、骨关节炎、由扩散至骨的肿瘤(例如前列腺癌、乳癌、多发性骨髓瘤等)导致的骨“穿孔”。

[0265] 使用适合的生长因子、趋化因子和细胞因子,细胞可被诱导分化以形成许多谱系,包括例如中胚层表型的多种细胞、神经外胚层表型的细胞(神经胶质细胞、少突胶质细胞和神经元)和内胚层表型的细胞。这些包括成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、软骨和骨细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、内皮细胞、造血细胞、神经细胞和上皮细胞。

[0266] 成骨细胞:已被诱导分化形成骨细胞的细胞可在以下疾病中的用作细胞治疗或用于组织再生:骨质疏松、佩吉特氏病、骨折、骨髓炎、骨坏死、软骨发育不全、成骨不全症、遗传性多发性外生骨疣、多发性骨骺发育不良、玛丽安氏综合征、粘多糖贮积症、神经纤维瘤病或脊柱侧凸、局部畸形的重建手术、脊柱裂、半椎骨或椎骨融合、肢体异常、肿瘤损伤组织的重建以及感染例如中耳感染后的重建。

[0267] 软骨细胞:已被诱导分化形成软骨细胞的细胞可在老化相关疾病或损伤、运动相关损伤或特定疾病中的用于细胞治疗或组织再生,所述特定疾病有例如类风湿性关节炎、银屑病关节炎、莱特尔氏关节炎(Reiter's arthritis)、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、强直性脊柱炎、骨关节炎、外耳的重建手术、鼻的重建手术以及环状软骨的重建手术。

[0268] 脂肪细胞:已被诱导分化形成脂肪细胞的细胞可被用于重建手术或整容手术的重塑,包括但不限于乳房切除后的乳房重建、由其他手术(例如从脸或手除去肿瘤)导致失去的组织的重塑、乳房增大以及减少皱纹。还可用于II型糖尿病的治疗。这样产生的脂肪细胞

还可以提供用于研究脂肪调节的有效体外模型系统。

[0269] 成纤维细胞：来自所述细胞的成纤维细胞可被用于细胞治疗或组织修复以促进伤口愈合或提供结缔组织支持(例如为整容手术提供支架)。

[0270] 骨骼肌：已被诱导分化形成骨骼肌细胞的细胞可在以下疾病的治疗中用于细胞治疗或组织修复：进行性假肥大性肌营养不良、贝克肌营养不良、肌强直性营养不良、骨骼肌病以及修复骨骼肌损伤的重建手术。

[0271] 平滑肌：已被诱导分化形成平滑肌细胞的细胞可在以下疾病的治疗中用于细胞治疗或组织修复：胃肠系统的发育异常(例如食管闭锁、肠闭锁和肠套叠)以及肠梗塞或结肠造口术手术后的组织替换。平滑肌细胞还可被用于膀胱或子宫重建、新血管形成、由例如动脉粥样硬化或动脉瘤损伤的血管的修复。平滑肌前体细胞(肾小球系膜细胞)可被用作肾小球疾病的体外模型或用于糖尿病性神经病变中的细胞治疗或组织再生。平滑肌前体还可被用于修复远曲小管或肾小球旁组织的致密斑。

[0272] 心肌细胞：心肌细胞可在心肌梗死(伴随在瓣膜替换过程中由先天性心脏畸形导致的或者由心肌病或心内膜炎导致的充血性心力衰竭)之后心脏组织受损的治疗中用于细胞治疗或组织修复。

[0273] 小胶质细胞：小胶质细胞可被用于治疗脊髓损伤和神经退行性疾病，例如亨廷顿氏病、帕金森氏病、多发性硬化和阿尔茨海默病，以及用于修复在影响中枢神经系统的传染病过程中受损的组织。已被遗传改变以产生细胞因子的小胶质细胞还可被用于移植以治疗由于血脑屏障而使进入受限的中枢神经系统传染病。胶质细胞还可被用于产生生长因子或生长因子抑制剂，以用于中风(由多发性硬化、肌萎缩性脊髓侧索硬化症和脑癌导致)后神经组织的再生以及用于脊髓损伤后的再生。

[0274] 基质细胞：基质细胞可被用作移植细胞用于化学治疗后骨髓替换和骨髓移植。

[0275] 内皮细胞：内皮细胞可被用于治疗第八凝血因子缺乏症以及用于产生新血管生成的血管发生。内皮细胞还可以提供用于使用血管生成抑制剂进行肿瘤抑制的体外模型，以及用于血管炎、超敏反应和凝固障碍的体外模型。

[0276] 造血细胞：造血细胞可被用于在高剂量化学治疗后重新填充骨髓。来自所述集合体细胞的造血细胞可被进一步分化形成储存在血库中的血细胞，缓解输血时血液供应受限制的问题。

[0277] 神经外胚层细胞：小胶质细胞可被用于治疗脊髓损伤和神经退行性疾病，例如亨廷顿氏病、帕金森氏病、多发性硬化和阿尔茨海默病，以及用于修复在影响中枢神经系统的传染病过程中受损的组织。已被遗传改变以产生细胞因子的小胶质细胞还可被用于移植以治疗由于血脑屏障而使进入受限的中枢神经系统传染病。胶质细胞还可被用于产生生长因子或生长因子抑制剂，以用于中风(由多发性硬化、肌萎缩性脊髓侧索硬化症和脑癌导致)后神经组织的再生以及用于脊髓损伤后的再生。被诱导形成少突胶质细胞和星形胶质细胞的细胞，可被用于例如移植到脱髓鞘的组织，尤其是脊髓，在此所述细胞发挥作用使周围的神经组织髓鞘化。所述细胞还可被用于细胞替换治疗和/或基因治疗以治疗先天性神经退行性疾病或贮积症，例如粘多糖贮积病、脑白质营养不良(球形细胞脑白质营养不良、卡纳万病)、岩藻糖苷沉积症、GM2神经节苷脂贮积症、尼曼-皮克病、圣菲利波综合征、沃尔曼氏病和泰-萨克斯病。它们还可被用于外伤性病症例如中风、CNS出血和CNS创伤；用于周围神

经系统病症例如脊髓损伤或脊髓空洞症;用于视网膜病症例如视网膜剥离、黄斑变性和其他退行性视网膜病症,以及糖尿病视网膜病变。

[0278] 外胚层上皮细胞:细胞可被用于细胞替换治疗和/或基因治疗以治疗或缓解皮肤病症的症状,例如脱发、皮肤缺损例如烧伤创面和白化病。

[0279] 内胚层上皮细胞:上皮细胞可被用于细胞替换治疗和/或基因治疗以治疗或缓解多种器官病症的症状。所述细胞可被用于治疗或缓解先天性肝脏病症,例如,贮积症例如粘多糖贮积病、脑白质营养不良、GM2神经节苷脂贮积症;胆红素增加的病症,例如克里格勒一纳贾尔综合征;氨病症,例如先天性尿素循环失调,例如鸟氨酸脱羧酶缺乏症、瓜氨酸血症和精氨基琥珀酸尿;先天性氨基酸和有机酸失调,例如苯丙酮尿症、遗传性酪氨酸血症和α-抗胰蛋白酶缺乏症;以及凝固障碍例如第八因子和第九因子缺乏症。所述细胞还可被用于治疗由病毒感染导致的获得性肝脏病症。所述细胞还可被用于离体应用,例如用以生成人工肝脏,以产生凝固因子并产生由肝脏上皮细胞生成的蛋白质或酶。所述上皮细胞还可被用于细胞替换治疗和/或基因治疗以治疗或缓解胆病症的症状,例如胆汁性肝硬化和胆管闭锁。所述上皮细胞还可被用于细胞替换治疗和/或基因治疗以治疗或缓解胰腺病症的症状,例如胰管闭锁、胰腺炎症和α-抗胰蛋白酶缺乏症。进一步地,因为可以制备胰腺上皮细胞和神经细胞,所以可以生成B细胞。这些细胞可被用于治疗糖尿病(皮下植入或者胰内或肝内植入)。进一步地,所述上皮细胞还可被用于细胞替换治疗和/或基因治疗以治疗或缓解肠上皮病症的症状,例如肠闭锁、炎症性肠道病症、肠梗塞和肠切除。

[0280] 细胞用于组织修复:细胞还可被用于组织修复。细胞可被植入到骨中以增强修复过程,加强变弱的骨,或进行关节面再造。软骨细胞可被注入到关节以进行关节软骨面再造。Caplan et al.(美国专利No.5,855,619)描述了一种生物基质植入物,其包括已掺入间充质干细胞的收缩的(contracted)凝胶基质。所述植入物被设计用于修复组织缺损,尤其用于腱、韧带、关节盘或肌肉的损伤。例如,软骨可通过在多孔的三维支架(例如由胶原、合成聚乙醇酸纤维或合成聚乳酸纤维制备)周围的直接区域加入软骨细胞而形成。发明人已经证明,本发明的细胞可分化形成软骨细胞,例如其可以堆积在胶原、合成聚乙醇酸或合成聚乳酸或其他支架材料中及其周围以提供植入物以帮助组织修复。

[0281] 细胞还可被用于产生用于移植的组织或器官。Oberpenning et al.(Nature Biotechnology17:149-155(1999))报告了可工作膀胱的形成,是通过培养来自犬膀胱外部的肌肉细胞和来自所述犬膀胱内部的衬细胞,从这些培养物制备组织薄片,并用其包覆小的聚合物球,使肌肉细胞在外侧,衬细胞在内侧。然后,将所述球加入到狗的泌尿系统,在此其开始作为膀胱起作用。Nicklason et al.(Science284:489-493(1999))报告了从培养的平滑肌和内皮细胞产生多种长度的血管移植材料。用于从培养的细胞形成组织层的其他方法是本领域技术人员已知的(参见例如Vacanti et al.,美国专利No.5,855,610)。

[0282] 为了本文描述的目的,可通过直接注入到组织位点、全身注入、注入到可接受基质的表面上或周围,或者结合可药用载体而将自体的、同种异体的或异种的细胞以遗传改变或未改变的分化或未分化形式给予患者。

[0283] 用于研究分化途径的模型系统

[0284] 本发明提供一种使用所述集合体或来自所述集合体的细胞来表征对生物试剂或药学试剂的细胞反应的方法,包括使所述细胞与一种或多种生物试剂或药学试剂接触并鉴

定对所述一种或多种生物试剂或药学试剂的一种或多种细胞反应。这样的试剂可具有多种活性。它们可以影响分化、代谢、基因表达、活力等。因此，所述细胞可用于例如毒性测试以及鉴定分化因子。

[0285] 本发明的细胞还可用于进一步研究发育过程。例如Ruley et al.(WO 98/40468)已经描述了用于抑制特定基因表达以及获得这些被抑制基因的DNA序列的载体和方法。可以用载体例如由Ruley描述的那些载体来处理本发明的细胞，所述载体可抑制可通过DNA序列分析来鉴定的基因的表达。然后，可将所述细胞诱导至分化，并且可以表征改变的基因型/表型的效应。

[0286] 例如，Hahn et al.(Nature400:464-468(1999))证明了，当将之前与癌症有关的基因组合引入到正常的人上皮成纤维细胞时，所述细胞可被诱导发生致瘤性转化。

[0287] 使用含有可诱导表达元件的载体控制基因表达，提供了一种研究特定基因产物对细胞分化的效应的方法。可诱导表达系统是本领域技术人员已知的。这种系统之一是由No et al.(Proc.Natl.Acad.Sci.USA93:3346-3351(1996))描述的可蜕皮激素诱导的系统。

[0288] 细胞可被用于研究特定基因改变、毒性物质、化疗剂或其他试剂对发育通路的效应。本领域技术人员已知的组织培养技术使得可大规模培养来自不同个体的成百上千的细胞样品，这提供了对被怀疑是例如致畸或诱变的化合物进行快速筛选的机会。

[0289] 为研究发育通路，可用特定的生长因子、细胞因子或其他试剂(包括可疑的致畸化学品)来处理细胞。还可使用本领域已知的方法和载体对细胞进行遗传修饰。此外，可使用反义技术或用引入到所述细胞中的蛋白质进行处理来改变细胞以改变固有基因序列的表达。例如，可使用信号肽序列来将需要的肽或多肽引入到细胞中。一种尤其有效的将多肽和蛋白质引入到细胞中的技术已经由Rojas,et al.在Nature Biotechnology16:370-375(1998)进行了描述。该方法产生了多肽或蛋白质产物，其可被引入到培养基中并易位跨越细胞膜到达所述细胞的内部。可以以这种方式使用任何数量的蛋白质来确定靶蛋白对细胞分化的效应。或者，可使用由Phelan et al.(Nature Biotech.16:440-443(1998))描述的技术将疱疹病毒蛋白VP22连接到功能蛋白上以导入细胞中。

[0290] 还可通过引入外源DNA或通过沉默或切除基因组DNA来对细胞进行基因工程改造，以产生具有缺陷表型的分化细胞，以测试潜在的化疗剂或基因治疗载体的效果。

[0291] 试剂盒

[0292] 细胞可与适当的包装材料一块在试剂盒中提供。例如，可以以冻存液的形式提供细胞，附有独立包装的如本文之前所述的适当因子和培养基，用于在正常单层中培养和/或作为未分化状态的集合体培养。另外，还可以提供用于诱导分化的独立包装的因子。

[0293] 本发明将通过参照以下详细的实施例进一步描述。

[0294] 实施例

[0295] 实施例1.多能成体祖细胞(MAPC)的自组装

[0296] 已经从骨髓、外周血、脐带血、胎儿和成人肝脏中鉴定了几种干细胞或祖细胞，并且胚胎干细胞具有在体外或体内增殖并分化为“肝细胞样”细胞的潜能。从产后的大鼠、小鼠和人骨髓分离的多能成体祖细胞(MAPC)可以在体外扩增而不衰老，在单细胞水平上在体外和体内分化为三个胚层谱系的不同细胞类型。MAPC具有当被移植时不形成畸胎瘤并且可从自体骨髓中选择而不需要免疫抑制的优势。

[0297] 发明人研究了MAPC自组装为3D集合体的能力。MAPC被成功诱导为3D集合体，当在“MAPC培养基”和5%氧气中形成时，所述3D集合体展示出良好的活力、形态以及未分化表型(表达高水平的oct3/4并无分化标志物的表达)。所述集合体保留了进行自发的多谱系分化的能力。除了获得功能上更成熟的分化细胞的优势以外，3D培养物提供了用于研究初生3D发育的独特模型系统，并且可以潜在地帮助设计可被监控和控制以增强分化的可放大培养系统。

[0298] 因此，发明人鉴定了用于使3D球状簇中的未分化MAPC最佳生长的条件，并评估了其分化为几种细胞类型(尤其是内胚层谱系的细胞类型)的潜能。他们发现，未分化MAPC可在培养中形成3D集合体，并且所述3D集合体保留了分化能力。

[0299] 实验

[0300] 使用MAPC培养基、无LIF(白血病抑制因子)的MAPC培养基或分化基础培养基，在低氧和高氧两种条件中，使用所述悬滴法(表面张力驱使)或强制聚集方法(离心)历时4天用表达高水平oct3/4的大鼠MAPC克隆形成了MAPC集合体。在所述两种方法中使用了400-4000个细胞/孔的起始细胞数。使用流式细胞术和定量实时聚合酶链式反应(QRT-PCR)对形成的MAPC集合体进行表征，含LIF的MAPC培养基和低氧条件是最佳的，因为在集合体形成之前和之后的MAPC之间oct3/4mRNA的表达水平是相当的，并且在集合体形成前的MAPC中表达(约79%)的细胞数的几乎90%以形成集合体后的蛋白质水平(约69%)表达oct3/4。进一步地，oct3/4mRNA水平在使用悬滴法或强制聚集方法形成的集合体之间是相当的。所述集合体还以与在MAPC中的表达水平相当的水平表达GATA6、HNF3b和Goosecoid，并且没有显示出分化标志物例如AFP、白蛋白、AAT和TAT的任何表达。一旦在分化基础培养基(除去了LIF、PDGF和EGF)中自发分化，所述细胞集合体就进行自发分化以表达对应于神经外胚层的Nestin和Pax6、对应于中胚层的Flk-1和SM22以及对应于内胚层的白蛋白。虽然上述全部工作是使用大鼠高表达oct3/4的MAPC，但是低表达oct3/4的大鼠MAPC也可形成具有分化为几种细胞类型的能力的集合体。还证明了，来自小鼠MAPC克隆的3D集合体也保持了所述集合体中oct3/4的表达并且随后一旦被转移到分化基础培养基就进行自发分化。

[0301] 使用之前为肝细胞分化优化的方案使大鼠高oct3/4的MAPC集合体分化时，所述分化的结果——基于肝标志物例如白蛋白、AFP、TTR、AAT和TAT的表达——与同时进行的高密度2D分化是相当的。因此，明显地，所述3D集合体能够从“MAPC样”表型起始进行显著水平的到肝谱系的分化。

[0302] 所述分化集合体的功能和结构性质：白蛋白ELISA用于评估白蛋白分泌速率，PAS染色用于糖原贮积，免疫染色用于研究到基础、顶点和侧面域的极化，并使用透射电子显微镜(TEM)阐明超结构的特性。另外，还探索了使用这些表达oct3/4的MAPC集合体作为用于MAPC的可放大扩增的可能方法。

[0303] 材料和方法

[0304] “MAPC培养基”

[0305] MAPC培养基含有60%(v/v)低葡萄糖型Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)(11885,Gibco BRL,Carlsbad,CA,USA)、40%(v/v)MCDB-201(M6770,Sigma)、1%(v/v)1×胰岛素-硒-转铁蛋白(ITS;Sigma)、1%(v/v)1×亚油酸牛血清白蛋白(LA-BSA;Sigma)、5×10^{-8}M地塞米松(Sigma)、10^{-4}M抗坏血酸3-磷酸(Sigma)、100单位的青霉素、1000单位的链霉素、

2%(v/v)胎牛血清(FBS;Hyclone,Logan,UT,USA)、10ng/ml小鼠表皮生长因子(Sigma)、10ng/ml人血小板衍生生长因子(R&D systems,Minneapolis,MN,USA)、0.54%1×β-巯基乙醇以及1000单位/ml小鼠白细胞抑制因子。使用22μm滤器(Millipore,Billerica,MA,USA)对培养基灭菌,并保持在4℃,最长3-4周。

[0306] MAPC集合体的形成

[0307] 通过使用所述悬滴法或强制聚集方法来形成MAPC集合体。在悬滴法中:将MAPC以100-4000个细胞/孔接种在60孔微孔板(Nunc)的每孔20μl MAPC培养基中。然后将微孔板倒置并置于5%氧气、37℃的恒温箱中4-5天以使集合体形成。在强制聚集方法中,将100-4000MAPC/孔的96孔U型底超低附着板(Corning)以1500rpm离心4分钟,使细胞在5%氧气、37℃的恒温箱中在接下来的4-5天内聚集。

[0308] MAPC集合体的分化

[0309] 最近开发了针对培养基组分、氧气水平和细胞外基质优化的四步骤、21天分化方案,用于从MAPC高效分化为具有肝细胞的形态、表型和功能特性的细胞。所述四步骤方法由以下组成:(1)用50ng/mlWnt3a和100ng/ml激活素A培养MAPC6天;(2)然后用10ng/mlbFGF和50ng/ml BMP4培养步骤(1)的细胞4天;(3)然后用50ng/mlaFGF、10ng/ml FGF4和25ng/ml FGF8b培养步骤(2)的细胞4天;(4)然后用20ng/ml HGF和100ng/ml卵泡抑素培养步骤(3)的细胞7天。为了区别肝细胞样细胞或胆细胞样细胞,用卵泡抑素抑制活化素。在所述细胞分化前,大规模扩增未分化的MAPC直到获得几百万个细胞。然后,将细胞以50,000-60,000个细胞/cm^2铺板在基质胶(2%)包被的孔中。起初,在扩增培养基中培养细胞直到它们在16小时后达到80-90%汇合。然后,将细胞用PBS洗涤两次并将培养基转换为分化培养基。为了验证加入细胞因子是否有真实的肝细胞诱导效果,仅使用基础分化培养基进行分化。将所有细胞在基础分化培养基中在低氧(5%)条件下培养,所述基础分化培养基由DMEM(60%)、MCDB(40%)、抗坏血酸(1×)、青霉素/链霉素(1×)、β-巯基乙醇、胰岛素-硒-转铁蛋白(ITS)(0.25×)、LA-BSA(0.25×)和地塞米松(10^{-6}M)。使用了高浓度的地塞米松,因为某些肝细胞特定基因(即酪氨酸转氨酶、MRP2和色氨酸2,3双加氧酶)是受糖皮质激素上调的,因为所述基因含有糖皮质激素应答元件。完全没有血清时,出现细胞死亡。但是,使用Wnt3a在无血清条件下诱导了分化。如果不在基础分化培养基中加细胞因子,那么加入2%血清直到第12天,然后停止。因为高浓度的地塞米松与胰岛素一起可诱导脂肪形成,所以使用了较少量的胰岛素。

[0310] 实施例2.在2D和3D条件下大鼠MAPC谱系R2old和19分化的比较

[0311] 该研究的目标是证明,MAPC在作为3D集合体生长和培养时的多谱系分化能力。使用了两种谱系的大鼠MAPC:R2old和19,并将其作为3D集合体维持在MAPC维持条件(MAPC培养基,5%氧气)下持续16天时间。在所述16天时间的终点,解离3D集合体并重新铺板到纤连蛋白包被的皿,类似于大鼠MAPC的标准2D单层维持。随后,进行了生长因子介导的到肝细胞、内皮细胞和神经前体细胞的分化,并将所述分化与同一时间过程中进行的维持在2D单层培养中的大鼠MAPC的分化相比较。图11(A)、(B)和(C)通过定量实时(QRT)-PCR获得的的数据指示了对应于不同细胞类型的标志物的表达。从这些数据,作为3D集合体维持的细胞似乎保留了以与维持在2D培养中的细胞相当的水平进行多谱系分化的潜能。因此,MAPC可维持在3D培养中而不损失品质,因此使其可以在生物反应器中扩大培养。

[0312] 实施例3.

[0313] 材料和方法

[0314] 大鼠MAPC谱系的建立和维持

[0315] 该研究中使用了两个大鼠MAPC谱系。以前已经描述了大鼠MAPC谱系的分离(Breyer et al.2006;Ulloa-Montoya et al.2007)。简而言之,大鼠MAPC谱系是从4周龄雌性大鼠(Fischer)的胫骨和股骨分离的。将细胞以6×10^6/孔铺板在6孔组织培养板的MAPC培养基中,并在37℃、5%氧气和5.5%CO_2中培养在潮湿的恒温箱中。培养4周后,使用针对CD45和Ter119的磁性微珠(Miltenyi Biotec)除去造血细胞,并将剩余细胞以5个细胞/孔接种到96孔板。随后对孔中呈现小尺寸和梭形形态的细胞挑取并筛选MAPC表型(表达Oct4、Rex1和CD31)和三谱系分化潜能(Breyer et al.2006)。将建立的MAPC细胞系以300个细胞/cm^2的起始细胞密度维持在37℃、5%氧气和5-6%CO_2的恒温箱中的MAPC培养基中,每两天使用0.05%(w/v)的胰蛋白酶-EDTA(5mg/l Cellgro)传代(Breyer et al.2006)。

[0316] MAPC培养基

[0317] MAPC培养基由基础培养基组成,所述基础培养基为低葡萄糖型Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)(Gibco,USA)和MCDB-201(Sigma)的60/40(v/v)混合物,补充有0.026μg/ml抗坏血酸3-磷酸(Sigma)、亚油酸牛血清白蛋白(LA-BSA,Sigma)(终浓度为10^3μg/mlBSA和8.13μg/ml亚油酸)、胰岛素-硒-转铁蛋白(ITS,Sigma)(终浓度为10μg/ml胰岛素、5.5μg/ml转铁蛋白、0.005μg/ml亚硒酸钠)、0.02μg/ml地塞米松(Sigma)、4.3μg/mlβ-巯基乙醇和2%(v/v)合格的胎牛血清(Hyclone)。完全MAPC培养基还含有三种生长因子:人血小板衍生生长因子(PDGF-BB,R&D)(10ng/ml)、小鼠表皮生长因子(EGF,Sigma)(10ng/ml)和小鼠白血病抑制因子(LIF)(10^3单位/ml)(Chemicon,ESGRO)。使用的所有培养基还补充有100IU/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Gibco)。

[0318] MAPC集合体的静态板培养

[0319] 使用悬滴法(Kurosawa et al.2003)或强制聚集方法(Ng et al.2005)从MAPC的单个细胞形成MAPC集合体。简而言之,在所述悬滴法中将300-3000个单细胞悬浮在悬挂于倒置塑料表面(Nunc)的单滴培养基中,所述塑料表面含有60小滴的细胞和培养基,使每个都聚集为单独的集合体。在强制聚集方法中,将悬浮液中的细胞置于超低附着圆形底96孔板(Corning)的孔中,并以1500rpm离心4分钟,以使细胞沉降到孔底。除非另有说明,将所述沉降的细胞在37℃、5%氧气的恒温箱培养以使集合体随着时间形成。

[0320] 对于静态板培养,使用所述两种方法的任一种形成了MAPC集合体。当通过悬滴法形成时,将第4天的MAPC集合体以10个集合体/孔在超低附着24孔板(Corning)中培养。形成了强制聚集方法的集合体,并且在整个培养期都在96孔板中培养。在两种情形中,都使用了MAPC培养基和5%氧气的条件,每两天更换50%的培养基。同时还将MAPC集合体置于分化条件(无LIF、PDGF和EGF的MAPC培养基,21%氧气)作为维持培养。

[0321] MAPC集合体的悬浮瓶培养

[0322] 在悬浮培养前,使用强制聚集方法静态培养两天来形成MAPC集合体。然后,将集合体以50,000个细胞/ml的初始细胞浓度转移到250ml旋转瓶,将培养物以70rpm搅拌,并保持在有5%氧气控制的37℃恒温箱内。

[0323] MAPC集合体的解离

[0324] 为了将所述MAPC集合体解离为单细胞，将集合体用PBS洗涤一次并悬浮于37℃水浴中的预热的0.05%(w/v)胰蛋白酶-EDTA中15-20分钟。将所述集合体-细胞悬浮液用移液管吹打几次，随后再在水浴中孵育5分钟，直到在显微镜下观察到所述集合体解离为单细胞。

[0325] RNA分离和定量实时聚合酶链式反应(RT-qPCR)

[0326] 使用RNAeasy microkit(Qiagen)根据所述试剂盒中提供的说明书从rMAPC细胞裂解物中分离总RNA。使用Superscript III反转录酶(Invitrogen)方法从所提取的RNA合成cDNA。PCR反应混合物由cDNA样品、SYBR Green Mix PCR反应缓冲液(Applied Biosystems)以及引物(5μm储存液，序列在表1示出)组成。使用如下的程序在Realplex mastercycler(Eppendorf)上进行RT-qPCR反应：50℃维持2分钟，95℃维持10分钟，95℃维持15秒和60℃维持1分钟进行40个循环，然后进行解离方案以获得融解曲线。将相对于GAPDH的转录本丰度表示为$\log_2$(相对于GAPDH的转录本表达)并计算ΔCt，ΔCt是Ct(目的基因)-Ct(GAPDH)，相对于第0天的样品中转录本丰度表示为$\log_2$(相对于第0天的转录本表达水平)并计算为ΔCt(第0天)-ΔCt(取样日)。使用临界p值为0.05的Student's t检验来获得不同样品之间表达的任何显著性差异。

[0327] 通过流式细胞仪进行Oct4的细胞内染色

[0328] 将通过胰酶消化收获的细胞用含3%(v/v)血清的PBS洗涤，并以每FACS管100,000个细胞悬浮在含3%(v/v)血清的PBS中。在用4%低聚甲醛固定15-20分钟并在补充有10%驴血清的SAP缓冲液(含0.1%(w/v)皂苷和0.05%(w/v)叠氮化钠的PBS)中封闭1小时后，将细胞与在SAP缓冲液中稀释的1g/ml Oct3/4抗体(Santa-Cruz,N19)或羊IgG同种型对照(Jackson Immunoresearch)一起孵育1小时，然后与Cy5标记的抗羊IgG(Jackson Immunoresearch，在SAP缓冲液中1:500)一起孵育30分钟。最终，将细胞洗涤、过滤并重悬于500μlPBS中以使用FACS caliber(Becton Dickinson)进行流式细胞分析。

[0329] 用于评估保持MAPC分化潜能的体外定向分化

[0330] 神经外胚层分化

[0331] 将rMAPC以1500个细胞/cm^2在0.1%明胶包被的T75瓶中的神经分化培养基中培养2天，所述神经分化培养基由50%(v/v)DMEM/F12(Invitrogen)和50%(v/v)神经基础A培养基(Invitrogen)组成并补充有N2plus补充物(R&D systems)、B27(Invitrogen)、4.3g/mlβ-巯基乙醇、0.3mg/ml谷氨酰胺(Invitrogen)。在第2天，将培养基完全替换为补充有0.3mg/ml谷氨酰胺、N2plus补充物、4.3μg/mlβ-巯基乙醇和生长因子(碱性成纤维细胞生长因子(R&D,bFGF,10ng/ml)和EGF(Sigma,10ng/ml))的Euromed-N培养基(AnnovumEuroclone)。在第6天，将细胞用胰蛋白酶消化并重新铺板在0.1%明胶包被的T25瓶中的补充有bFGF(10ng/ml)和EGF(10ng/ml)的神经分化培养基中。在5%氧气条件下继续分化14天，每两天更换培养基。

[0332] 内皮细胞分化

[0333] 将rMAPC以45,000个细胞/cm^2的细胞密度培养在纤连蛋白(100ng/ml)包被的24孔板中的MAPC培养基中。约16小时后，将培养基完全替换为内皮细胞分化培养基，除了没有所述三种生长因子，地塞米松为0.4g/ml并且加入10ng/ml重组人VEGF(R&D)以外，所述内皮细胞分化培养基的组成与MAPC培养基是相同的。在21%氧气条件下继续分化20天，每两天更换50%的培养基。

[0334] 肝细胞分化

[0335] 将rMAPC以50,000个细胞/cm^2的起始细胞密度培养在基质胶(2%,BD)包被的24孔板孔中的MAPC培养基中,直到达到80-90%汇合。随后,将扩增培养基完全替换为分化基础培养基,除了ITS和LA-BSA是MAPC培养基中量的25%,地塞米松为0.4g/ml并且没有所述三种蛋白因子和血清以外,所述分化基础培养基的组成与MAPC培养基是相同的。此外,按如下加入额外的蛋白因子。按如下加入细胞因子和生长因子补充物:(i)第0天:100ng/ml的激活素A和50ng/ml的Wnt3a(ii)第6天:10ng/ml的bFGF和50ng/ml的BMP4(iii)第10天:25ng/ml的FGF8b、50ng/ml的aFGF和10ng/ml的FGF4(iv)第14天:20ng/ml的HGF和100ng/ml的卵泡抑素。在21%氧气条件下进行分化20天,对应于所述分化阶段每两天更换50%的培养基。在第0、6、10和14天,将完全培养基替换为含用于下个分化阶段的补充物的新培养基。

[0336] 时差显微镜

[0337] 将MAPC以1000个细胞/孔接种在超低附着圆底96孔板(Corning)中。通过位于37℃、5%CO_2以及5%或21%O_2的孵育系统中的显微镜(Leica)观察细胞的初始聚集48小时。在48小时内每4分钟对进行聚集的细胞拍照。从三个或更多个含有单个集合体的孔的平均值确定了集合体大小。

[0338] 透射电子显微镜

[0339] 将细胞集合体用0.1M二甲砷酸盐缓冲液洗涤三次并在2.5%戊二醛和0.1M二甲砷酸钠缓冲液(pH7.2)中固定40分钟。在1%四氧化锇和0.1M二甲砷酸盐缓冲液中后固定(post-fixation)后,将所述样品在梯度系列乙醇中脱水,然后用环氧丙烷处理,并嵌入到环氧树脂中。切下超薄切片,用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色,并使用明尼苏达大学表征研究所(Characterization facility at University of Minnesota)的JEOL 1200EXII电子显微镜进行检查。

[0340] E-钙粘蛋白染色

[0341] 将细胞集合体在4%低聚甲醛中固定30分钟并用PBS洗涤。将所述样品在PBS中的5%蔗糖中孵育过夜,用异戊烷过冷,然后在OCT中冷冻并获得切片。使用H_2O_2抑制内源性的过氧化物酶并与胎牛血清(FBS)孵育以减少非特异性结合。然后,将细胞与抗E-钙粘蛋白(BD)的抗体孵育或与同种型-匹配的阴性对照抗体(小鼠IgG2a)孵育,然后使用EnVision-过氧化物酶与DAB底物(Dako)使其可视化。

[0342] 细胞活力染色

[0343] 使用"live/dead viability/cytotoxicity kit"(Invitrogen)将集合体中的细胞用钙黄绿素和乙啡啶染色。首先将组分B加入到DPBS(1:1000)中,然后将组分A加入到含组分B的DPBS中(1:2000)。将细胞与所述染色溶液在37℃下孵育15-30分钟。将细胞用PBS洗涤一次并在倒置荧光显微镜(Axiovert200,Zeiss)下观察。活细胞和死细胞分别呈现绿色和红色。对检测死细胞的方案的验证是用通过在所述染色方案前30分钟在用0.1%(w/v)皂苷处理(以诱导基于透化的细胞死亡)的集合体中的细胞中观察到的红斑点来确认的。

[0344] 细胞周期分析

[0345] 将细胞在80%乙醇中固定并储存在-20℃。将固定的细胞用PBS洗涤两次,然后在4℃在含有50μg/ml碘化丙啶和0.1mg/ml RNA酶的PBS中染色过夜。洗涤后,将细胞过滤并重悬在500μl PBS中以使用FACS Calibur进行流式细胞分析。

[0346] 结果

[0347] MAPC自组装为细胞集合体

[0348] 使用两种已知方法——悬滴法和强制聚集方法——从MAPC的单个悬浮液形成了集合体。将rMAPC以3000-30,000个细胞/ml(或每孔或每滴300-3000个细胞)的起始细胞浓度接种,从每滴或每孔容易地形成了单个集合体。在5%或21%氧气中在完全MAPC培养基或无LIF、PDGF和EGF的MAPC培养基(分化培养基)中形成了集合体。对于所有研究,至少以三次重复测试了两种大鼠MAPC谱系。在第4天,在有5%氧气的完全MAPC培养基中形成了集合体,其以与培养在2D表面(5%氧气)的亲代MAPC谱系相当的水平表达Oct4、Rex1、CD31和HNF3b转录本,但不表达Afp——一种当MAPC自发分化时显示出快速上调的基因(图12a)。另外,通过流式细胞仪显示,在这些集合体中维持有Oct4蛋白表达(图12b)。相比之下,在21%氧气的MAPC培养基中形成的集合体是正在分化的,因为它们表达32倍的Afp转录本(图12c),表达Oct4蛋白的细胞的百分数减少约50%(图12d)。在无LIF、PDGF和EGF的MAPC培养基中形成集合体,即使有5%氧气,也导致了Oct4转录本的21倍下降(图12c),仅约4%的细胞表达Oct4蛋白(图12d)。因此,在集合体形成过程中,高的环境氧气浓度以及除去LIF、PDGF和EGF均负面地影响了Oct4表达,并导致分化。在完全MAPC培养基中在5%O_2下形成的MAPC集合体中的细胞还可被胰蛋白酶消化为单细胞悬浮液并在2D表面上重新培养,显示出典型的MAPC增殖谱和表型(图19)。

[0349] MAPC集合体及其形成的表征

[0350] 在细胞接种后4天,MAPC集合体有几乎不可分辨的细胞-细胞界限(图13a)。使用时差显微镜观察48小时内集合体形成的过程。在离心沉降到孔底后,单细胞聚集在一起达到540μm的平均大小。随后的压紧作用使细胞集合体有约250μm的大小。然后在初始聚集后48小时,集合体大小增加到约460μm(图13b)。每天通过胰酶消化解离10个集合体用于细胞计数。每集合体中的平均细胞数在4天内从每集合体1000增加至17,758个细胞(668±19μm,十个集合体的均值和标准差)(图13c)。

[0351] 在4天的形成过程中群倍增时间为约23小时,比在2D表面培养时观察到的(12-14小时)慢。在第1天至第3天的倍增时间约为12小时。在第3天和第4天之间,观察到细胞生长减慢(图13c)。通过流式细胞仪完成的细胞周期分析指示,与2D表面培养(40%)相比,集合体(第4天)中更大比例的MAPC(60%)处在G0/G1期(图20)。集合体的TEM分析显示出了有高核质比(MAPC的特征)的紧凑细胞。在细胞-细胞边界处观察到紧密连接(图13d)。免疫组织化学证明了集合体中的MAPC表达细胞膜相关粘附蛋白E-钙粘蛋白(图13e)。

[0352] 在培养中MAPC保留了分化潜能

[0353] 发明人然后检查了是否可以长时间地维持培养MAPC集合体而不丧失其特征表型。使MAPC集合体形成四天,随后将其在完全MAPC培养基或无LIF、PDGF和EGF的MAPC培养基中再保持六天,每两天更换50%的培养基。使用Oct4和Afp转录本表达的RT-qPCR来评估培养物的未分化状态。MAPC集合体维持了Oct4转录本水平,没有增加Afp转录本水平。但是,对于培养在无LIF、PDGF和EGF的MAPC培养基(有21%氧气)中的MAPC集合体,Oct4转录本表达下降,Afp转录本表达随着时间逐渐增加(图14a、14b)。在完全MAPC培养基的16天培养过程中,发生了细胞增殖,这表现为集合体大小增加或者从单个MAPC集合体上有小团细胞的出芽掉落以形成较小的集合体(图21)。

[0354] 培养16天后，通过胰酶消化将MAPC集合体解离为单细胞并通过流式细胞仪评估Oct4蛋白的表达(图14c、14d)。在16天培养的终点继续表达Oct4蛋白的细胞的比例(一个MAPC谱系为79%，另一个MAPC谱系为78%)与2D单层培养和第0天的MAPC集合体相似(图12b)。将这些细胞重新扩增，在2D表面以低细胞密度扩增传代两次后，使集合体衍生的细胞定向分化为内皮细胞、肝细胞和神经祖细胞谱系，并将所述分化与在整个培养期以低细胞密度在2D表面培养维持的MAPC的分化相比较。如图15所示，在分化中未能检测到显著差异(student's t检验，临界p值为0.05)。在神经细胞分化过程中，在作为集合体培养16天然后在2D表面培养的细胞以及在整个培养期在2D表面培养中维持的细胞中，均观察到了Sox2、Pax6和Nestin转录本表达水平的类似增加(图15a)。在内皮细胞分化中观察到了类似的结果，表现为Flk-1、Ve-钙粘蛋白、vWF、Enos转录本的表达增加(图15b)，并且在肝细胞谱系分化中观察到了类似的结果，表现为Afp、白蛋白、Aat和Tat转录本的表达增加(图15c)。因此，MAPC可作为集合体培养至少16天，具有全部三个谱系的分化潜能。

[0355] 在悬浮培养中扩增作为集合体的MAPC

[0356] 发明人还确定了是否可以在悬浮培养中扩增作为集合体的MAPC。所述培养用一个MAPC细胞系重复三次(图16)，用另一个MAPC谱系重复两次(图22)。在静态培养条件下2天形成MAPC集合体，然后将其接种到100ml工作体积的250ml旋转瓶中。在静态培养的前两天(第-2天至第0天)过程中，细胞浓度从10^4增长至5×10^4个细胞/ml。从悬浮培养的第0天至第2天，观察到细胞数又增加了6倍。在悬浮培养第2天，收获细胞集合体，所述瓶中的细胞浓度减少至50%，加入50ml新培养基。在6天培养的终点，对于rMAPC-1，获得了7×10^5个细胞/ml的最终细胞浓度(等于70倍扩增)(图16a)。在其他大鼠MAPC谱系的旋转扩增培养的第4天也获得了类似的细胞浓度(图22a)。

[0357] 用LIVE/DEAD细胞毒性试剂盒(Molecluar Probes)的染色证明了，所述集合体(第4天)内的细胞保留了高活力(图16b)。通过RT-qPCR评估了第-2天(来自2D维持培养的细胞)、第0天(在孔中聚集48小时后的细胞)以及第2和4天(旋转培养中的集合体)的关键MAPC基因例如Oct4、Rex1、CD31、Sall4和分化标志物Afp的转录本水平。在Oct4、Rex1、CD31和Sall4转录本中未能检测到差异，未观察到AFP表达增加(图16c、图22b)。另外，还通过流式细胞仪评估了Oct4蛋白的表达。在旋转瓶培养的终点继续表达Oct4蛋白的细胞的比例(第4天，一个MAPC谱系为77%，另一个MAPC谱系为74%)与对照2D表面培养(第4天，79%)是相似的(图16d、图22c)。因此，可扩增在搅拌悬浮培养中的细胞，而其无明显分化征兆。

[0358] 为评估培养在旋转器中的MAPC集合体是否持续具有相似的分化潜能，将第0、2和4天的集合体在24孔超低附着板上静态培养使其进行肝细胞分化。选择定向到肝细胞谱系的分化是因为体外药物测试应用需要大量的肝细胞。在收集自旋转培养不同点的细胞集合体的20天分化的终点，通过RT-qPCR评估了肝细胞特异性转录本的上调程度，在每种情况中都超过了起始细胞集合体中的表达水平。如由肝细胞特异性转录本Afp、白蛋白、Aat和Tat的上调所显示的，所述MAPC集合体(来自第0、2和4天)分化为“肝细胞样”细胞(图16e)。对于所有的起始细胞群来说，这些基因的上调水平是相似的。另外，来自每个分化的分化细胞还以0.7-0.8pg/细胞/天或者以成年大鼠肝细胞分泌水平的约10%分泌白蛋白，并且以4-7μg/天分泌尿素。因此，在旋转器培养中扩增的细胞也可被用于产生大量的“肝细胞样”细胞。

[0359] 讨论

[0360] 干细胞可为功能异常组织的再生和替换提供很大的潜能，并可作为研究正常分化过程、疾病模型以及药物毒性测试的工具。由于其在再生医学和研究中的重要性，开发强大的生物过程以产生大量干细胞及其分化衍生物的兴趣在增加。已经为培养不同的干细胞类型测试了数种生物反应器设计(广泛地综述见(Kehoe et al.2009;King and Miller2007;Kirouac and Zandstra2008))。在不同生物反应器中，基于搅拌釜的设计已经被最广泛地用于培养哺乳动物细胞，因为其容易维持同质环境，并可在线过程监测和控制。此外，过去已经积累的关于设计和操作的广泛经验和知识，这将可用于放大干细胞生物过程。

[0361] 参考文献

[0362] Abranches E, Bekman E, Henrique D, Cabral JM. 2007. Expansion of mouse embryonic stem cells on microcarriers. Biotechnol Bioeng 96(6): 1211-21.

[0363] Anjos-Afonso F, Bonnet D. 2007. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. Blood 109(3): 1298-306.

[0364] Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D′Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A and others. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). Blood 110(9):3438-46.

[0365] Breyer A, Estharabadi N, Oki M, Ulloa F, Nelson-Holte M, Lien L, Jiang Y. 2006. Multipotent adult progenitor cell isolation and culture procedures. Exp Hematol34(11): 1596-601.

[0366] Cameron CM, Hu WS, Kaufman DS. 2006. Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. Biotechnol Bioeng 94(5):938-48.

[0367] Cormier JT, zur Nieden NI, Rancourt DE, Kallos MS. 2006. Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors. Tissue Eng 12(11):3233-45.

[0368] D′Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. J Cell Sci 117(Pt 14):297 1-81.

[0369] D′Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. 2006. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. Bone 39(3):513-22.

[0370] Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra PW. 2004. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. Sten Cells 22(3):275-82.

[0371] Debeb BG, Galat V, Epple-Farmer J, Iannaccone S, Woodward WA, Bader M,Iannaccone P,Binas B.2009.Isolation of Oct4-expressing extraembryonic

endoderm precursor cell lines.PLoS One 4(9):e7216.

[0372] Fok EY,Zandstra PW.2005.Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. Stem Cells23(9):1333-42.

[0373] Frauenschuh S, Reichmann E,Ibold Y,Goetz PM,Sittinger M,Ringe J.2007.A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells.Biotechnol Prog23(1):187-93.

[0374] Frith JE,Thomson B,Genever P.2009.Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential.Tissue Eng Part C Methods.

[0375] Galat V,Binas B,Iannaccone S,Postovit LM,Debeb BG,Iannaccone P.2009.Developmental potential of rat extraembryonic stem cells.Stem Cells Dev 18(9):1309-18.

[0376] Gilbertson JA,Sen A,Behie LA,Kallos MS.2006.Scaled-up production of mammalian neural precursor cell aggregates in computer-controlled suspension bioreactors.Biotechnol Bioeng 94(4):783-92.

[0377] Grayson WL,Zhao F,Izadpanah R,Bunnell B,Ma T.2006.Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs.J Cell Physiol 207(2):331-9.

[0378] Griffith LG,Swartz MA.2006.Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. Nat Rev Mol Cell Biol7(3):211-24.

[0379] Guan K,Nayernia K,Maier LS,Wagner S,Dressel R,Lee JH,Nolte J,Wolf F,Li M,Engel W and others. 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature440(7088):1199-203.

[0380] Gupta S,Verfaillie C, Chmielewski D,Kren S,Eidman K,Connaire J,Heremans Y,Lund T,Blackstad M,Jiang Y and others.2006.Isolation and characterization of kidney-derived stem cells.J Am Soc Nephrol17(11):3028-40.

[0381] Hevehan DL,Papoutsakis ET,Miller WM.2000.Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis.Exp Hematol 28(3):267-75.

[0382] Javazon EH,Beggs KJ,Flake AW.2004.Mesenchymal stem cells:paradoxes of passaging.Exp Hematol32(5):414-25.

[0383] Jiang Y,Jahagirdar BN,Reinhardt RL,Schwartz RE,Keene CD,Ortiz-Gonzalez XR,Reyes M,Lenvik T,Lund T,Blackstad M and others.2002.Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418(6893):41-9.

[0384] Kehoe DE,Jing D,Lock LT,Tzanakakis EM.2009.Scalable Stirred-suspension Bioreactor Culture of Human Pluripotent Stem Cells.Tissue Eng Part A.

[0385] Keller PJ,Pampaloni F,Stelzer EH.2006.Life sciences require the third dimension.Curr Opin Cell Biol18(1):117-24.

[0386] Kelm JM,Timmins NE,Brown CJ,Fussenegger M,Nielsen LK.2003.Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types.Biotechnol Bioeng83(2):173-80.

[0387] King JA,Miller WM.2007.Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation.Curr Opin Chem Biol 11(4):394-8.

[0388] Kirouac DC,Zandstra PW.2008.The systematic production of cells for cell therapies.Cell Stem Cell 3(4):369-81.

[0389] Kogler G,Sensken S,Airey JA,Trapp T,Muschen M,Feldhahn N,Liedtke S,Sorg RV,Fischer J,Rosenbaum C and others.2004.A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.J Exp Med 200(2):123-35.

[0390] Krawetz R,Taiani JT,Liu S,Meng G,Li X,Kallos MS,Rancourt D.2009.Large-Scale Expansion of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells in Stirred Suspension Bioreactors.Tissue Eng Part C Methods.

[0391] Kucia M,Reca R,Campbell FR,Zuba-Surma E,Majka M,Ratajczak J,Ratajczak MZ.2006.A population of very small embryonic-like(VSEL)CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+stem cells identified in adult bone marrow.Leukemia20(5):857-69.

[0392] Kurosawa H.2007.Methods for inducing embryoid body formation:in vitro differentiation system of embryonic stem cells.J Biosci Bioeng103(5):389-98.

[0393] Kurosawa H,Imamura T,Koike M,Sasaki K,Amano Y.2003.A simple method for forming embryoid body from mouse embryonic stem cells.J Biosci Bioeng96(4):409-11.

[0394] Li Q,Liu Q,Cai H,Tan WS.2006.A comparative gene-expression analysis of CD34+hematopoietic stem and progenitor cells grown in static and stirred culture systems.Cell Mol Biol Lett11(4):475-87.

[0395] Liu T,Zhang S,Chen X,Li G,Wang Y.2009.Hepatic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells in Three-dimensional Polymer Scaffolds.Tissue Eng Part A.

[0396] Lock LT,Tzanakakis ES.2009.Expansion and differentiation of human embryonic stem cells to endoderm progeny in a microcarrier stirred-suspension culture.Tissue Eng Part A15(8):2051-63.

[0397] Luttun A,Ross JJ,Verfaillie C,Aranguren XL,Prosper F.2006.Differentiation of multipotent adult progenitor cells into functional endothelial and smooth muscle cells.Curr Protoc Immunol Chapter 22:Unit22F9.

[0398] Mostafa SS,Miller WM,Papoutsakis ET.2000.Oxygen tension influences the differentiation,maturation and apoptosis of human megakaryocytes.Br J Haematol111 (3):879-89.

[0399] Ng ES,Davis RP,Azzola L,Stanley EG,Elefanty AG.2005.Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid

bodies fosters robust,reproducible hematopoietic differentiation.Blood106(5):1601-3.

[0400] Niwa H.2007.How is pluripotency determined and maintained? Development134(4):635-46.

[0401] Oh SK,Chen AK,Mok Y,Chen X,Lim UM,Chin A,Choo AB,Reuveny S.2009.Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells.Stem Cell Res.

[0402] Ong SM,Zhao Z,Arooz T,Zhao D,Zhang S,Du T,Wasser M,van Noort D,Yu H.2009.

[0403] Engineering a scaffold-free 3D tumor model for in vitro drug penetration studies.Biomaterials.

[0404] Pampaloni F,Reynaud EG,Stelzer EH.2007.The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.Nat Rev Mol Cell Biol8(10):839-45.

[0405] Pochampally RR,Smith JR,Ylostalo J,Prockop DJ.2004.Scrum dcprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes.Blood103(5):1647-52.

[0406] Potapova IA,Brink PR,Cohen IS,Doronin SV.2008.Culturing of Human Mesenchymal Stem Cells as Three-dimensional Aggregates Induces Functional Expression of CXCR4 That Regulates Adhesion to Endothelial Cells.J Biol Chem283(19):13100-7.

[0407] Purpura KA,George SH,Dang SM,Choi K,Nagy A,Zandstra PW.2008.Soluble Flt-1 regulates Flk-1 activation to control hematopoietic and endothelial development in an oxygen-responsive manner.Stem Cells26(11):2832-42.

[0408] Ralston A,Rossant J.2005.Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo.Clin Genet 68(2):106-12.

[0409] Ratajczak MZ,Zuba-Surma EK,Wysoczynski M,Ratajczak J,Kucia M.2008.Very small embryonic-like stem cells:characterization,developmental origin,and biological significance.Exp Hematol36(6):742-51.

[0410] Reyes M,Lund T,Lenvik T,Aguiar D,Koodie L,Verfaillie CM.2001.Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells.Blood98(9):2615-25.

[0411] Rizzino A.2009.Sox2 and Oct-3/4:A Versatile Pair of Master Regulators that Orchestrate the Self-renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells by Functioning as Molecular Rheostats.Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med1(2):228-236.

[0412] Sancho-Bru P,Najimi M,Caruso M,Pauwelyn K,Cantz T,Forbes S,Roskams T,Ott M,Gehling U,Sokal E and others.2009.Stem and progenitor cells for liver

repopulation:can we standardise the process from bench to bedside?Gut58(4):594-603.

[0413] Schwartz RE,Reyes M,Koodie L,Jiang Y,Blackstad M,Lund T,Lenvik T,Johnson S,Hu WS,Verfaillie CM.2002.Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells.J Clin Invest 109(10):1291-302.

[0414] Subramanian K,Geraerts M,Pauwelyn KA,Park Y,Owens DJ,Muijtjens M,Ulloa-Montoya F,Jiang Y,Verfaillie CM,Hu WS.Isolation procedure and characterization of multipotent adult progenitor cells from rat bone marrow.Methods Mol Biol636:55-78.

[0415] Ulloa-Montoya F,Kidder BL,Pauwelyn KA,Chase LG,Luttun A,Crabbe A,Geraerts M,Sharov AA,Piao Y,Ko MS and others.2007.Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity.Genome Biol8(8):R163.

[0416] Yamada KM,Cukierman E.2007.Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D.Cell 130(4):601-10.

[0417] Yoon YS,Wecker A,Heyd L,Park JS,Tkebuchava T,Kusano K,Hanley A,Scadova H,Qin G,Cha DH and others.2005.Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction.J Clin Invest115(2):326-38.

[0418] Yu Y,Li K,Bao C,Liu T,Jin Y,Ren H,Yun W.2009.Ex vitro expansion of human placenta-derived mesenchymal stem cells in stirred bioreactor.Appl Biochem Biotechnol159(1):110-8.

[0419] Zhao F,Ma T.2005.Perlusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development.Biotechnol Bioeng91(4):482-93.

[0420] zur Nieden NI, Cormier JT,Rancourt DE,Kallos MS.2007.Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors.J Biotechnol 129(3):421-32.

[0421] 本领域技术人员应该理解，在不背离本发明宽的发明构思的前提下，可对上述的实施方案作出改变。因此，应该理解，本发明不限于所公开的具体实施方案，而是意欲涵盖处于本发明精神和范围内的修改。

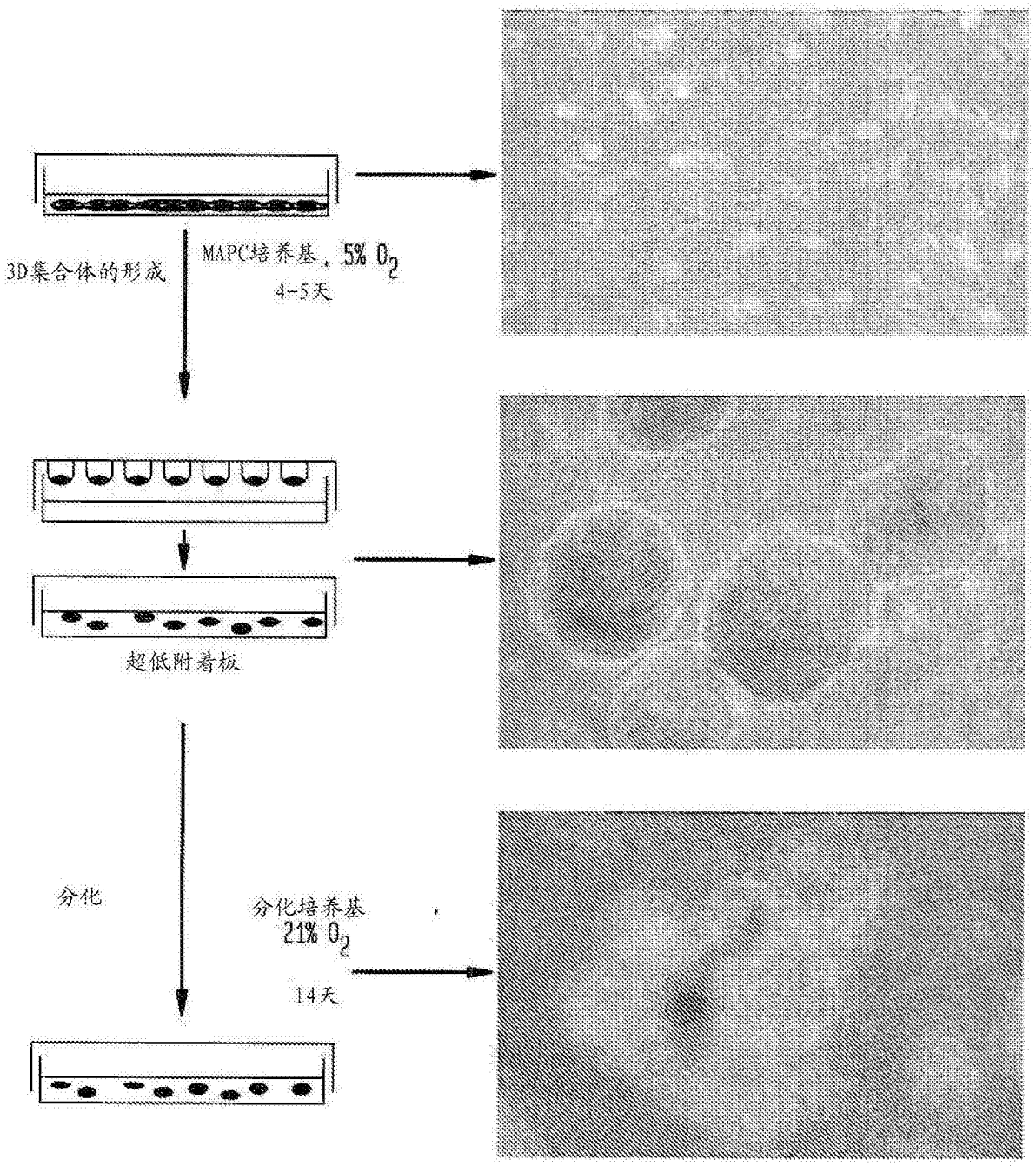


图1

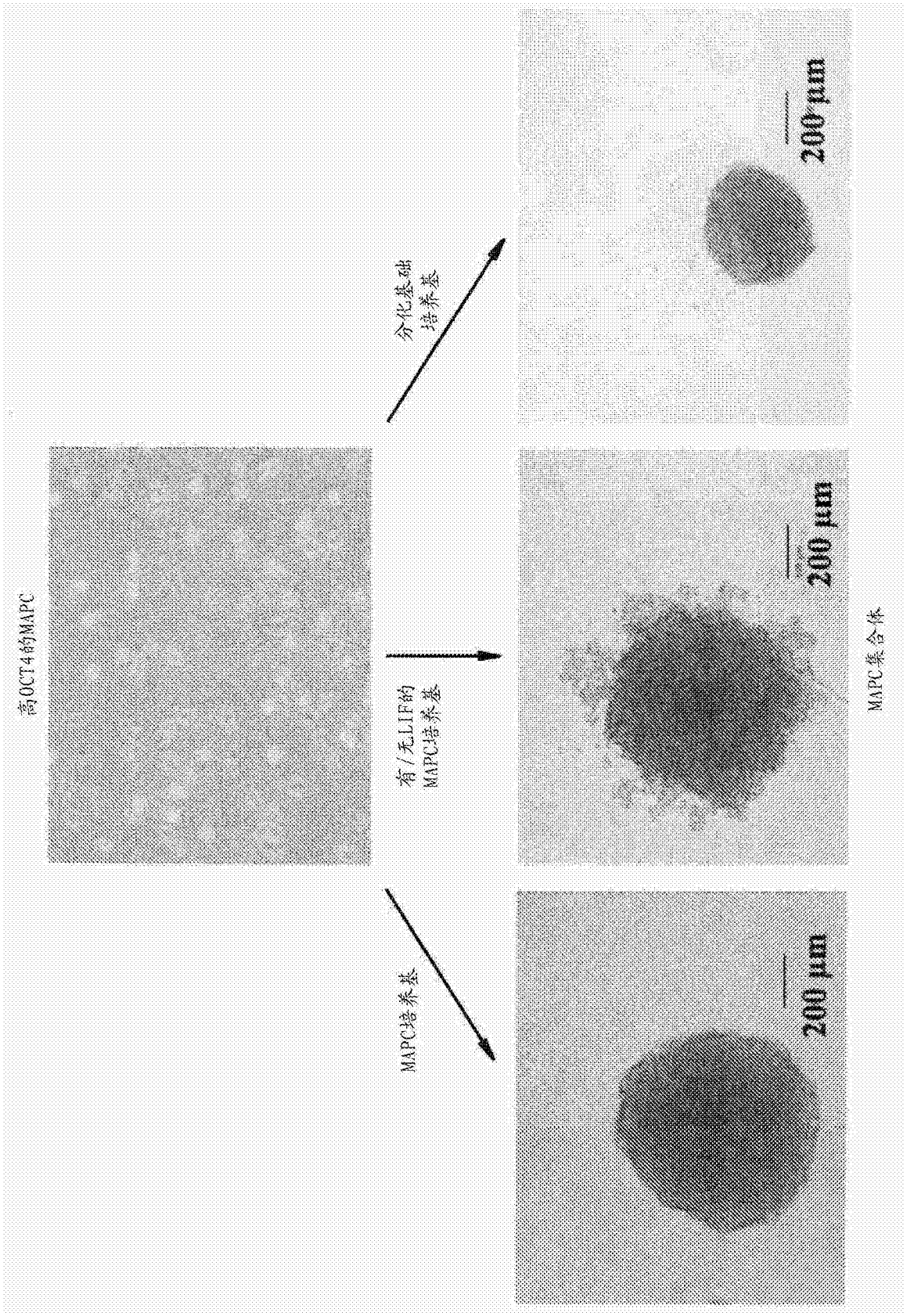

高OCT4的MAPC
有/无LIF的
MAPC培养基
MAPC培养基
分化基础
培养基
200 μm
200 μm
200 μm
MAPC集合体

图2

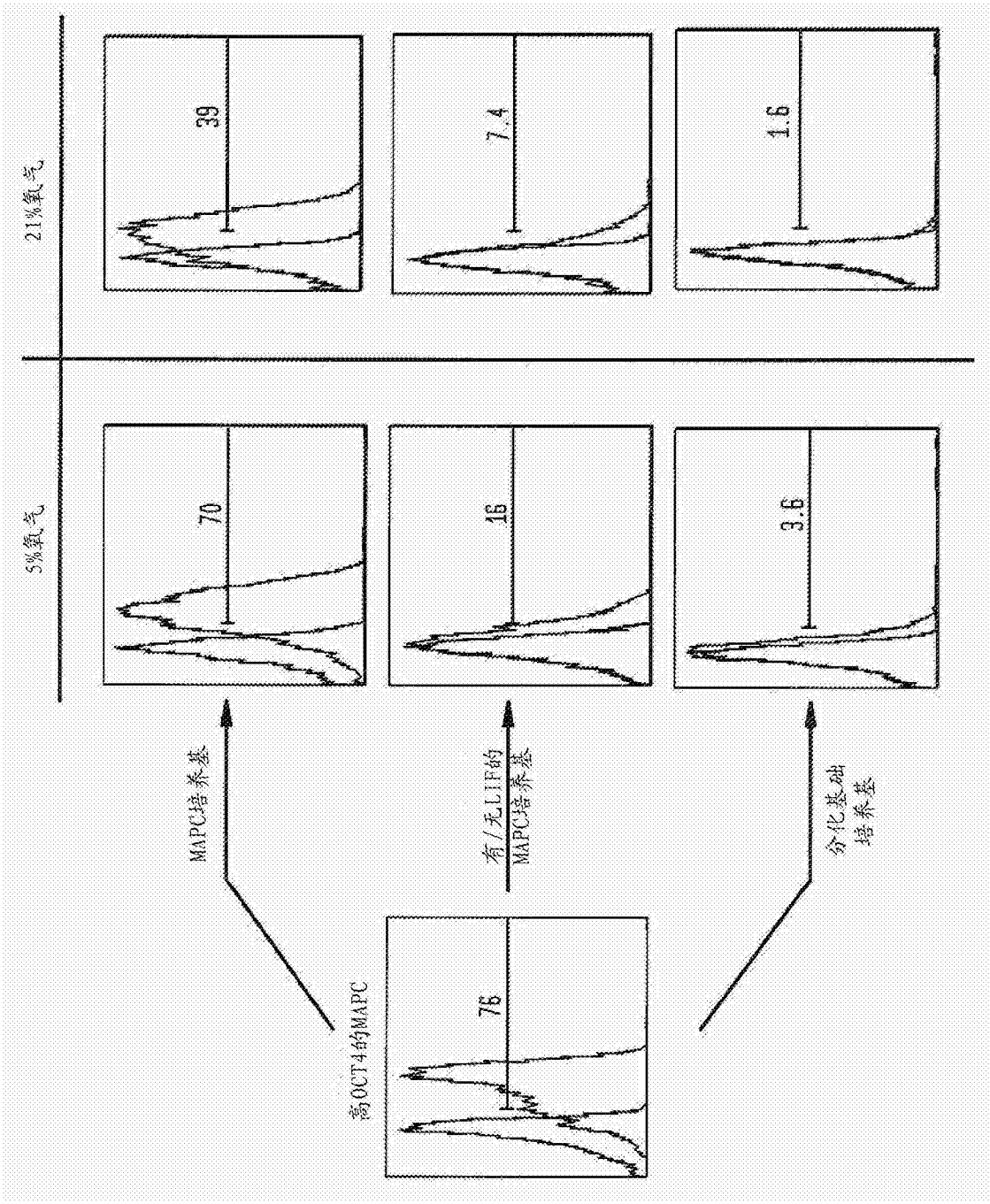

21%氧气
5%氧气
39
7.4
1.6
70
16
3.6
76
MAPC培养基
有/无LIF的
MAPC培养基
分化基础
培养基
高OCT4的MAPC

图3

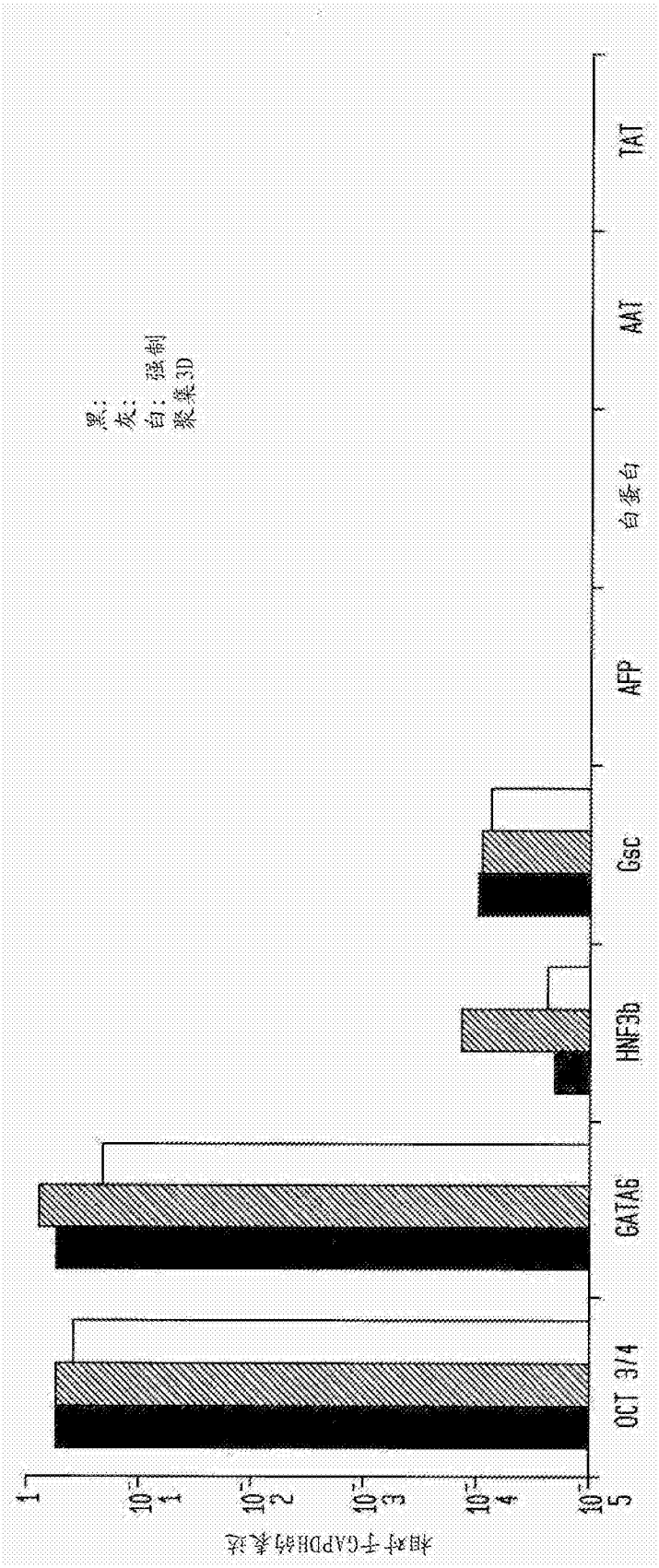

黑：
灰：
白：强制
聚集3D
相对于GAPDH的表达
1
10-1
10-2
10-3
10-4
10-5
OCT 3/4
GATA6
HNF3b
Gsc
AFP
白蛋白
AAT
TAT

图4

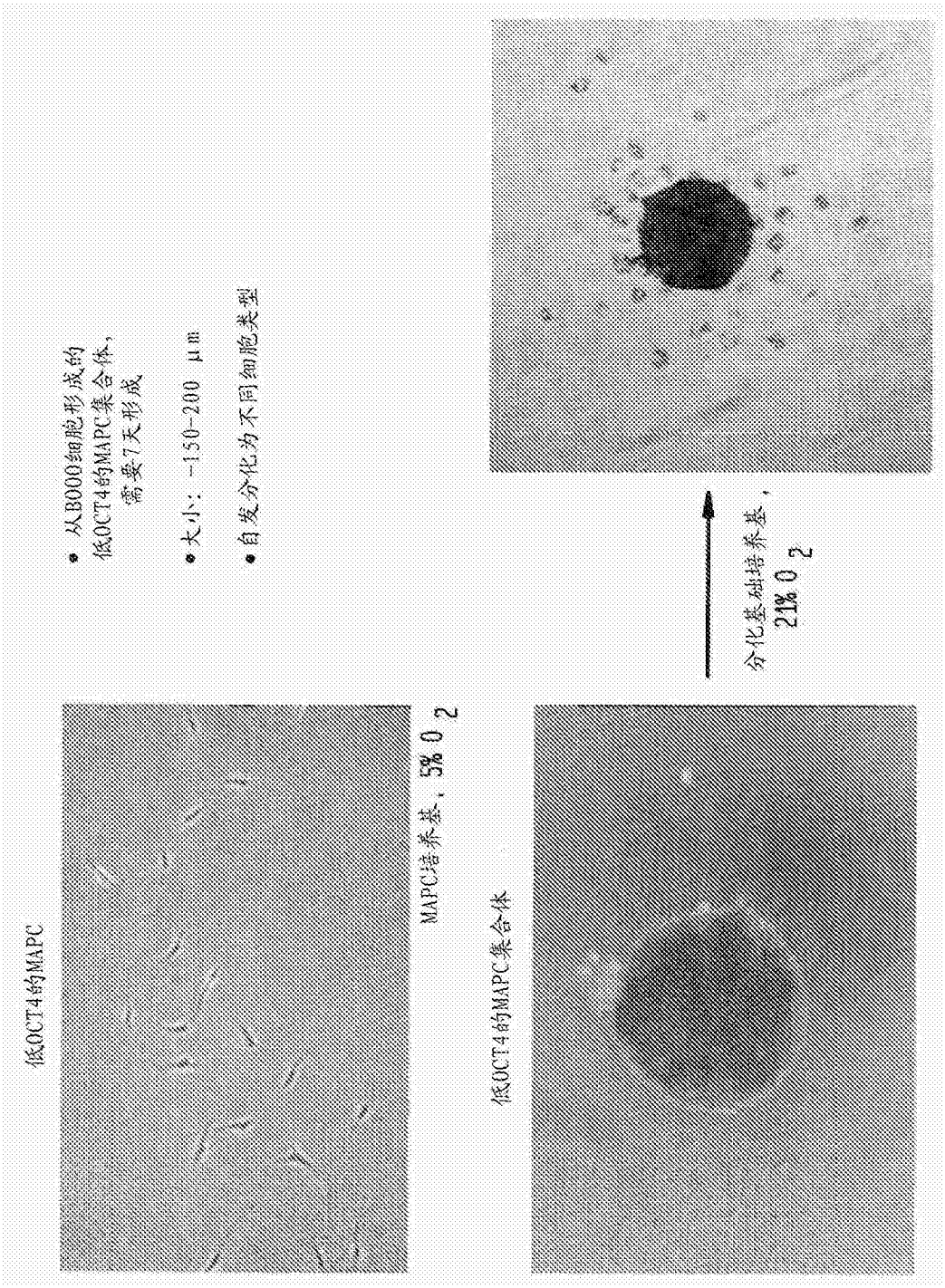

低OCT4的MAPC
MAPC培养基，5% O 2
低OCT4的MAPC集合体
分化基础培养基，
21% O 2
• 从BOOD细胞形成的
低OCT4的MAPC集合体，
需要7天形成
• 大小：~150-200 μm
• 自发分化为不同细胞类型

图5

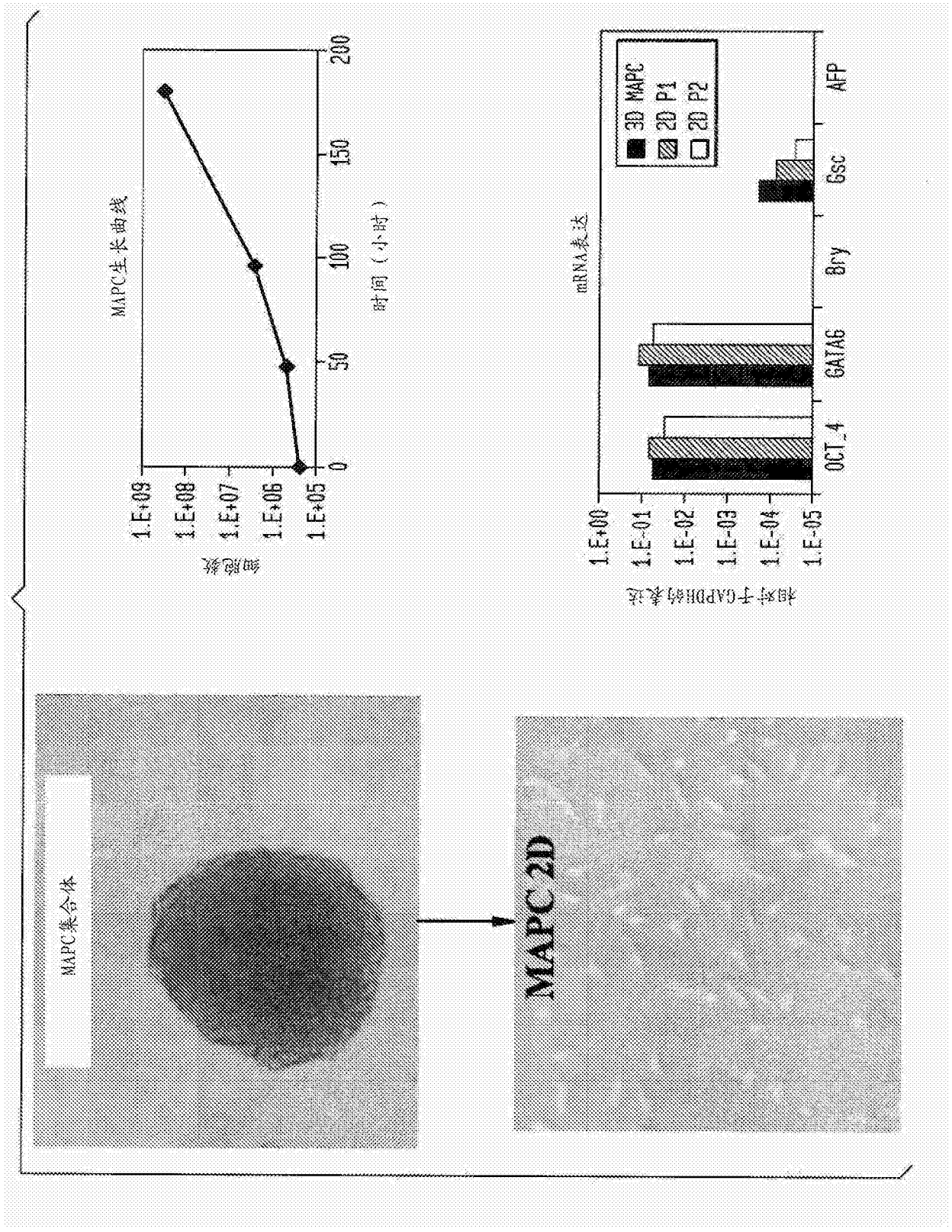

MAPC集合体
MAPC 2D
MAPC生长曲线
细胞数
时间（小时）
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
0
50
100
150
200
mRNA表达
相对于GAPDH的表达
3D MAPC
2D P1
2D P2
1.E+00
1.E-01
1.E-02
1.E-03
1.E-04
1.E-05
OCT_4
GATA6
Bry
Gsc
AFP

图6

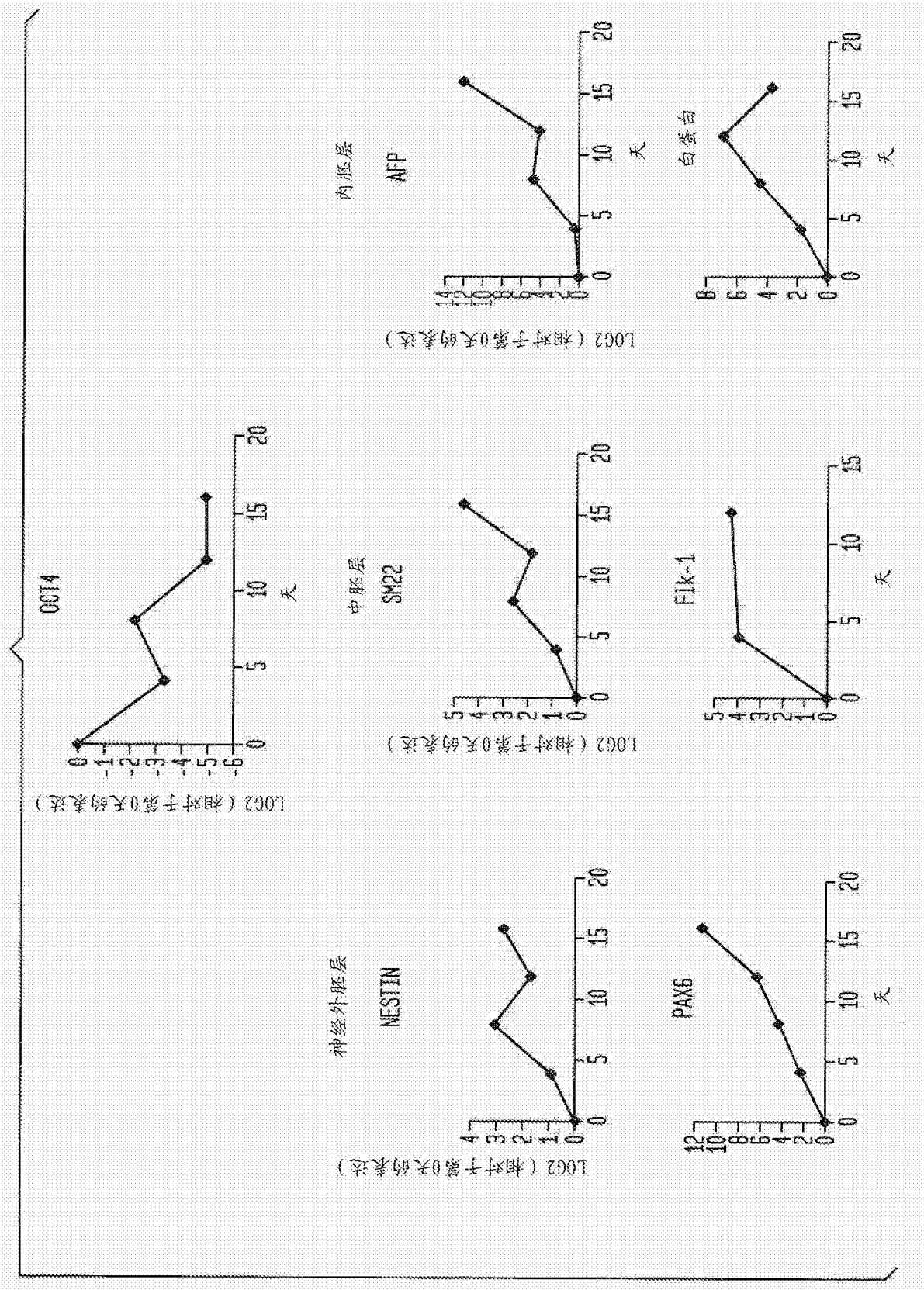

OCT4
LOG2（相对于第0天的表达）
天
中胚层
SM22
Flk-1
内胚层
AFP
白蛋白
神经外胚层
NESTIN
PAX6

图7

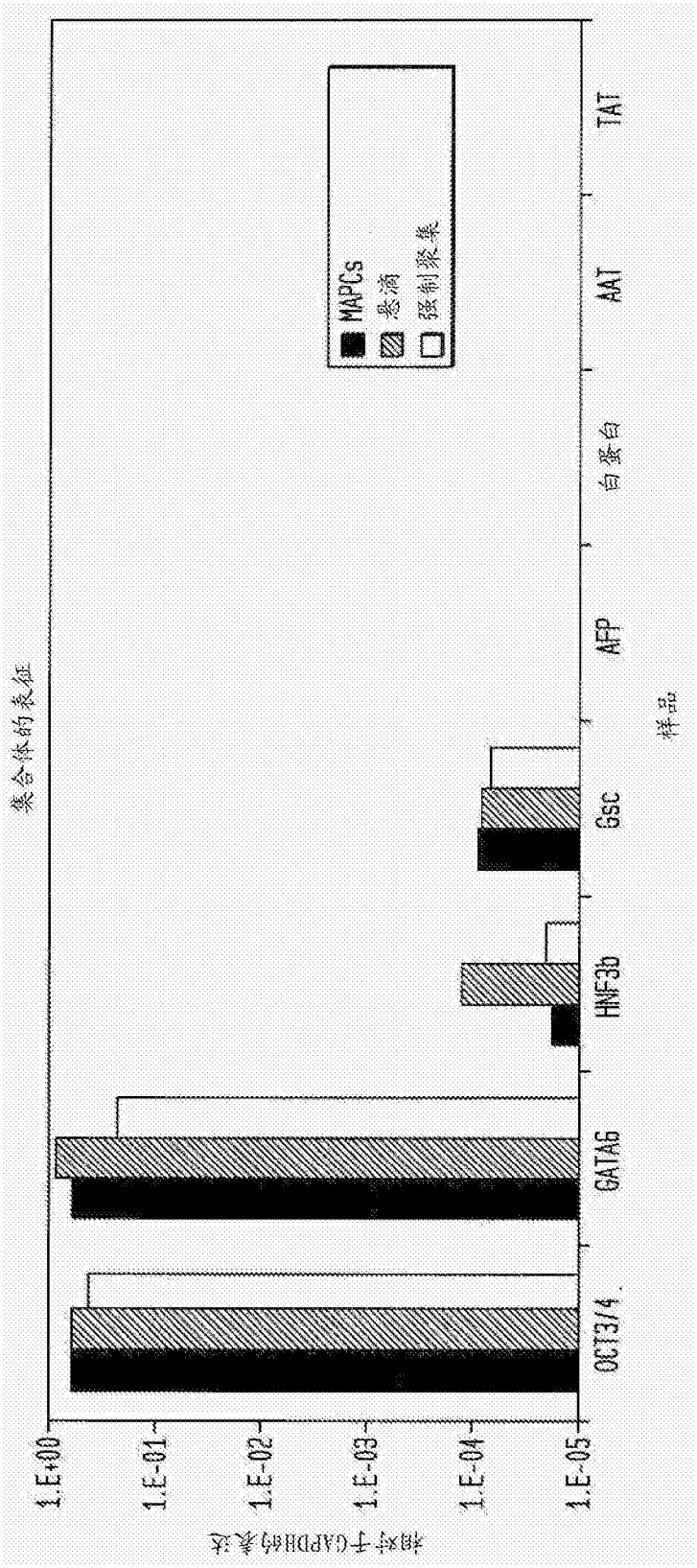

MAPCs
悬滴
强制聚集
1.E+00
1.E-01
1.E-02
1.E-03
1.E-04
1.E-05
相对于GAPDH的表达
集合体的表征
OCT3/4
GATA6
HNF3b
Gsc
AFP
白蛋白
AAT
TAT
样品

图8

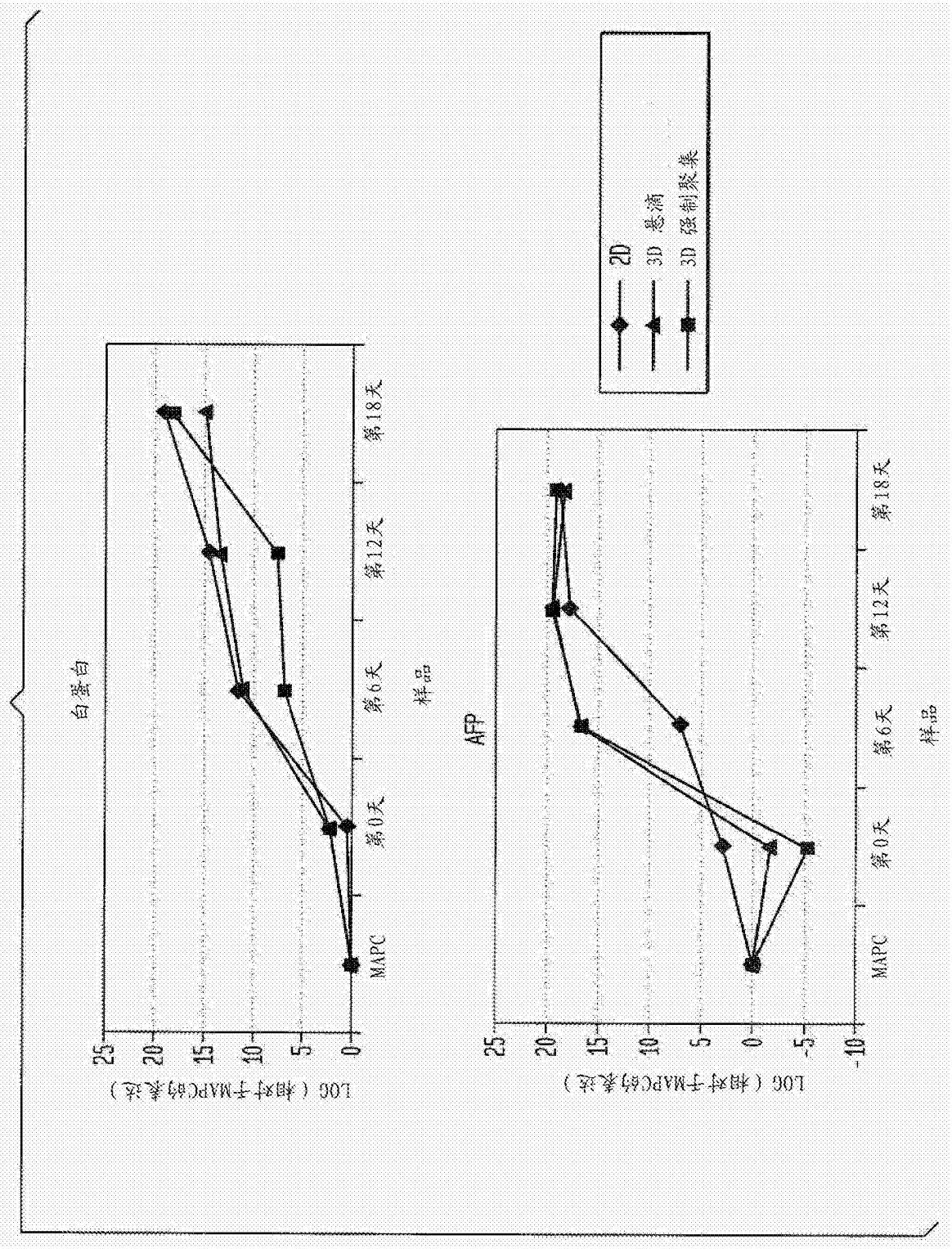

白蛋白
AFP
LOG（相对于MAPC的表达）
MAPC
第0天
第6天
第12天
第18天
样品
2D
3D 悬滴
3D 强制聚集

图9

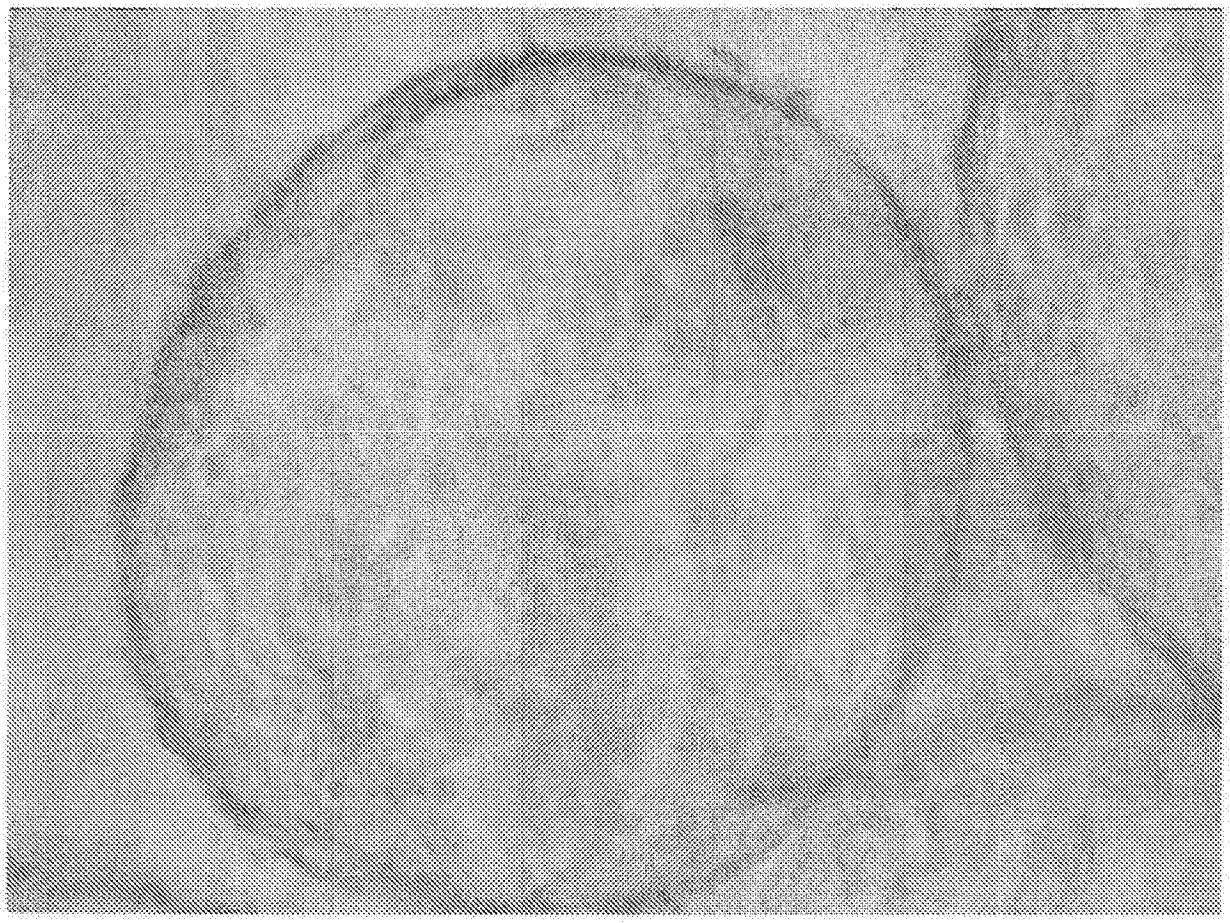


图10

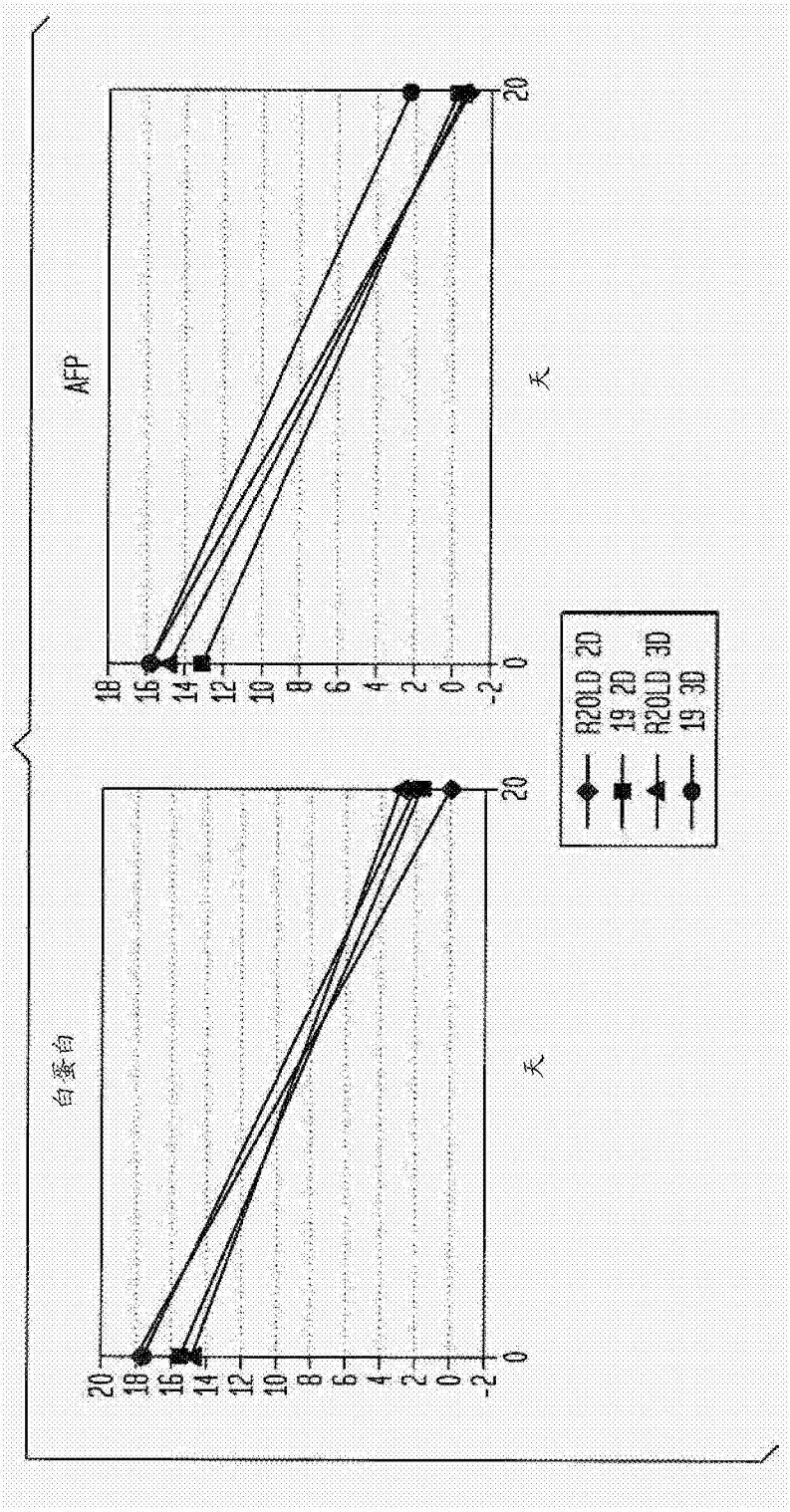


图11A

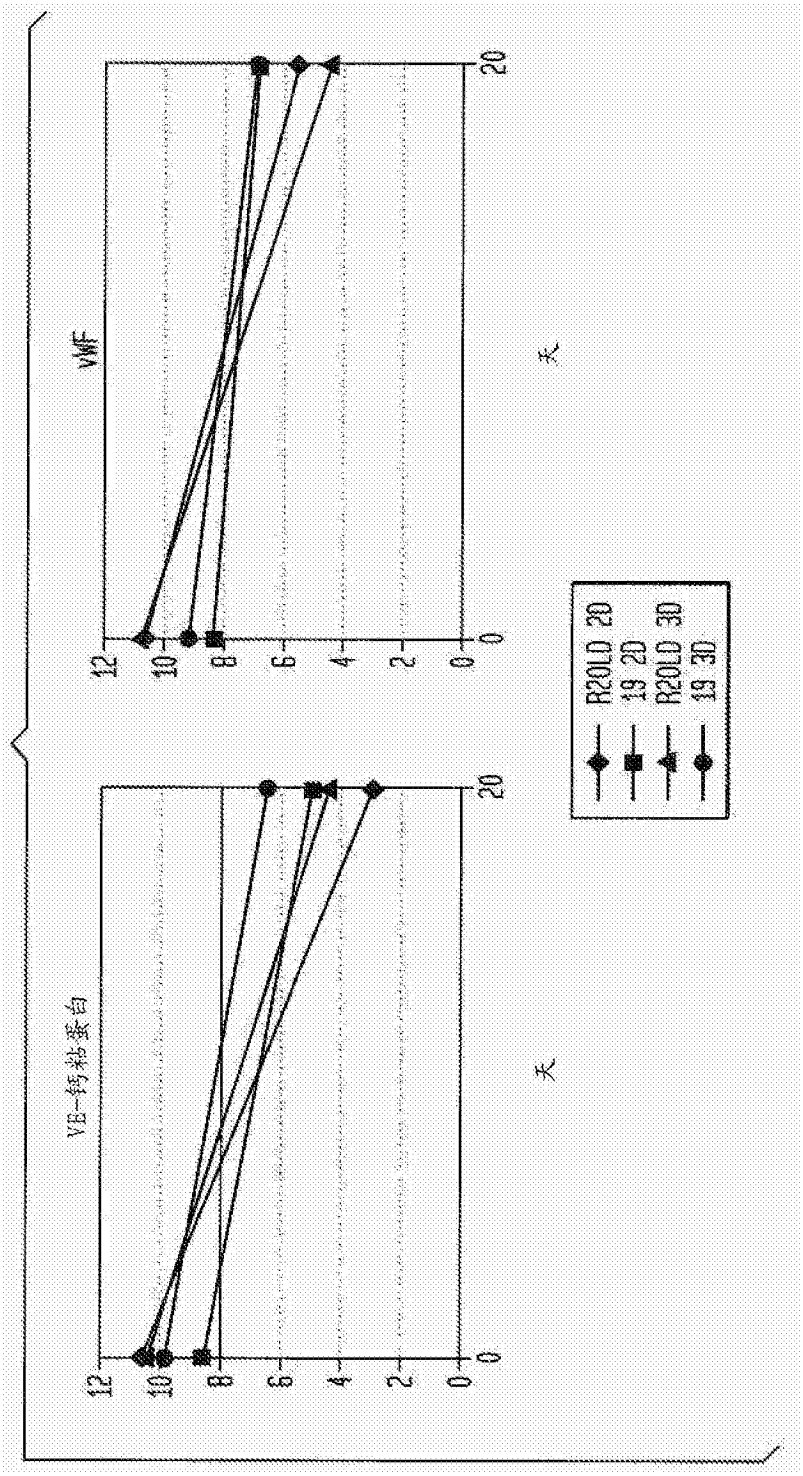


图11B

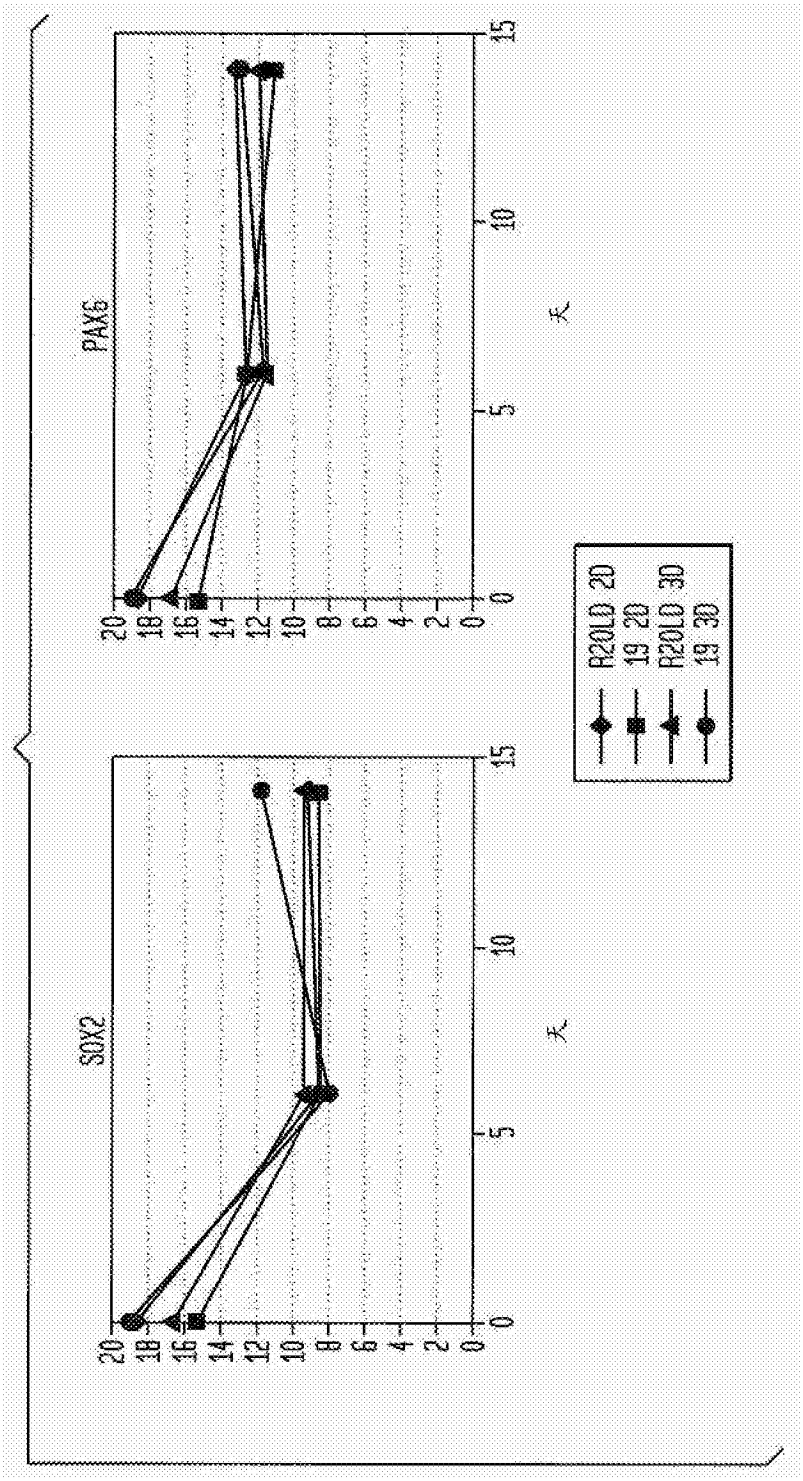


图11C

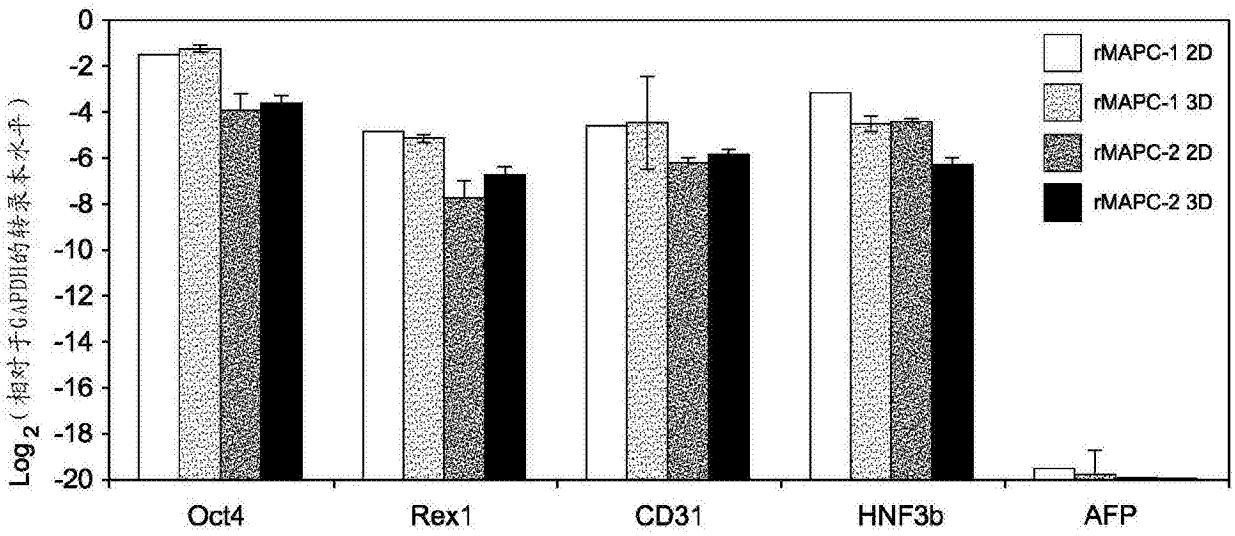

0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
-20
Log2(相对于GAPDH的转录本水平)
rMAPC-1 2D
rMAPC-1 3D
rMAPC-2 2D
rMAPC-2 3D
Oct4
Rex1
CD31
HNF3b
AFP

图12a

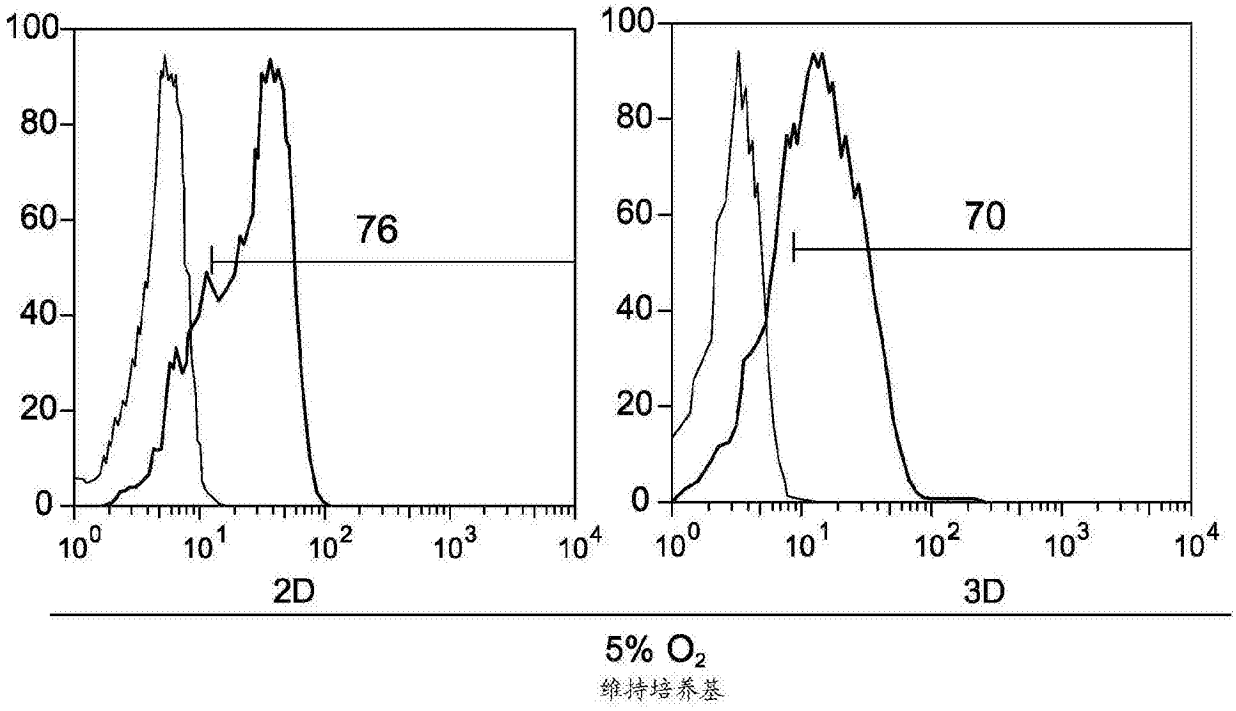

100
80
60
40
20
0
76
70
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
2D
3D
5% O_2
维持培养基

图12b

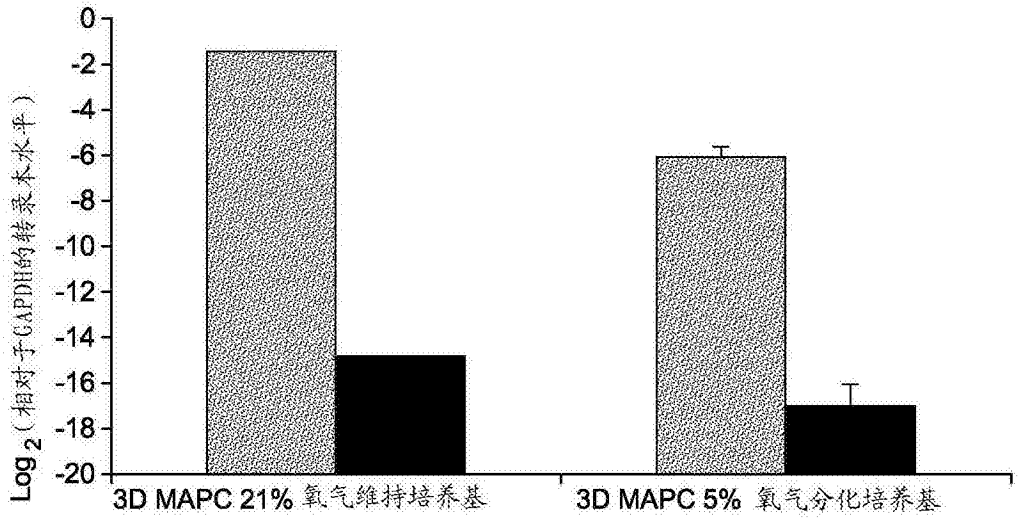

0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
-20
Log2(相对于GAPDH的转录本水平)
3D MAPC 21% 氧气维持培养基
3D MAPC 5% 氧气分化培养基

图12c

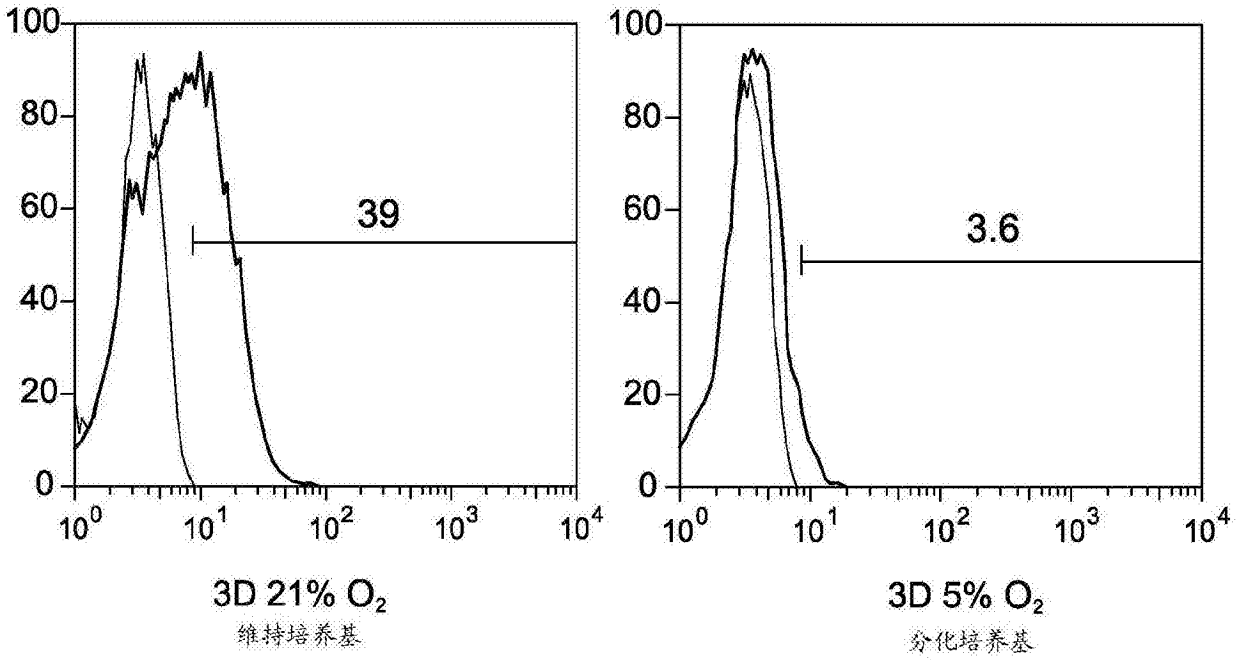

100
80
60
40
20
0
39
3.6
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
3D 21% O_2
维持培养基
3D 5% O_2
分化培养基

图12d

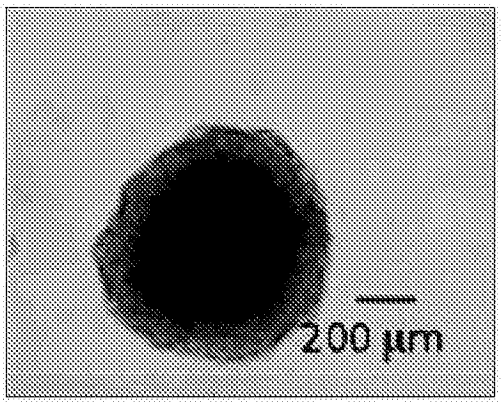


图13a

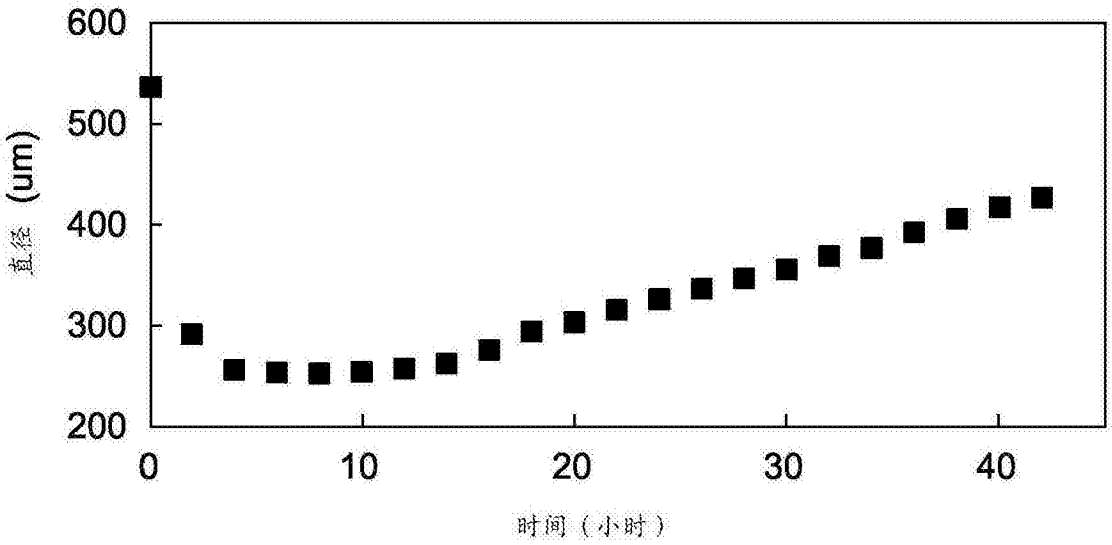


图13b

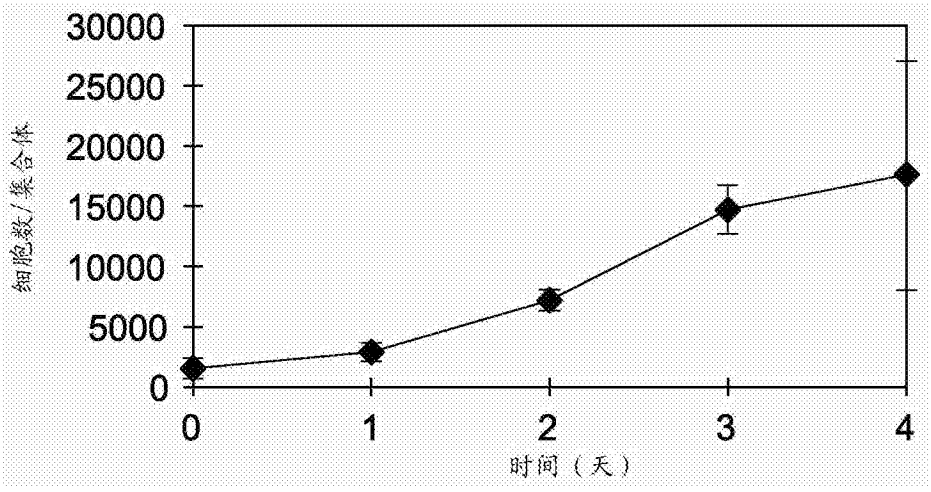


图13c

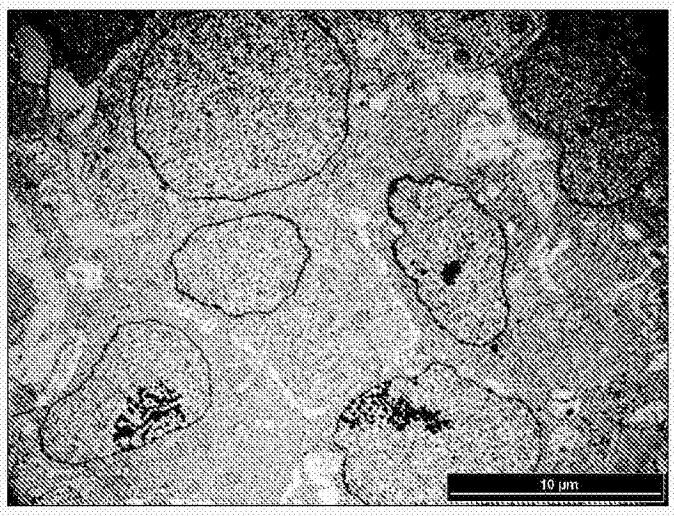


图13d

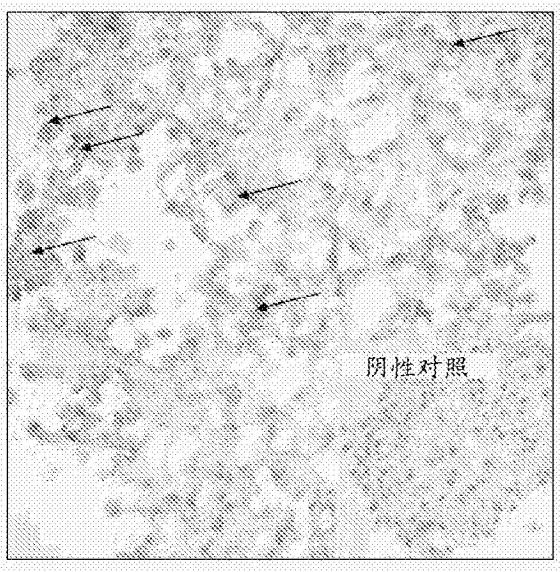


图13e

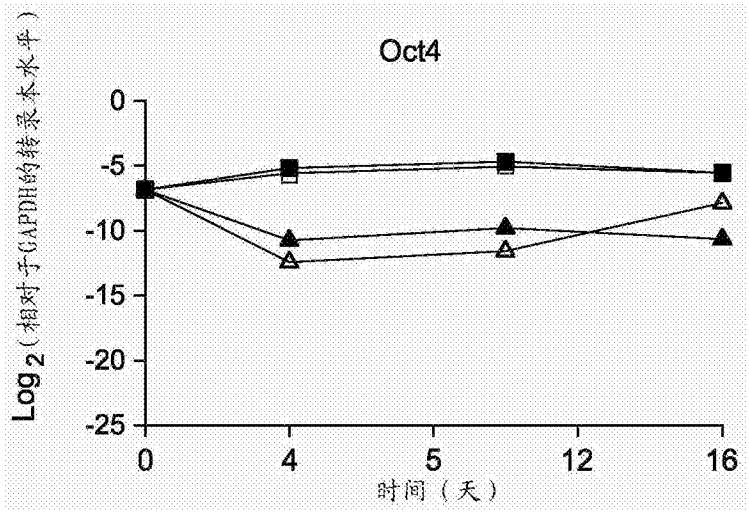

Oct4
Log2（相对于GAPDH的转录本水平）
0
-5
-10
-15
-20
-25
0
4
5
12
16
时间（天）

图14a

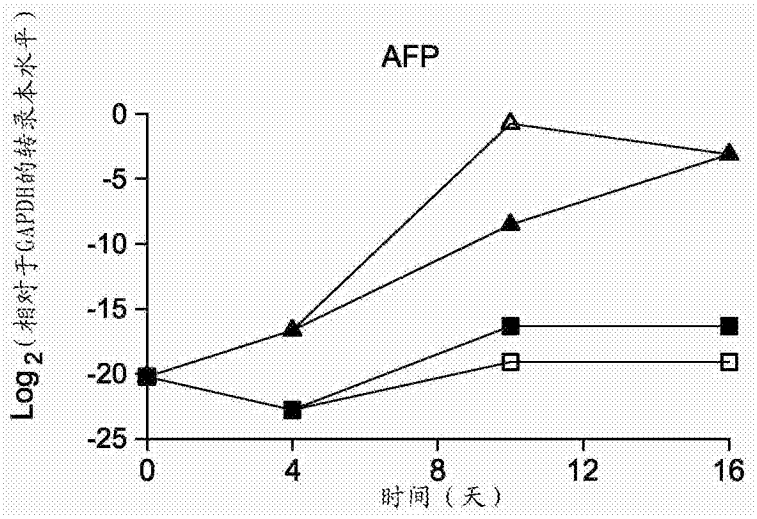

AFP
Log2（相对于GAPDH的转录本水平）
0
-5
-10
-15
-20
-25
0
4
8
12
16
时间（天）

图14b

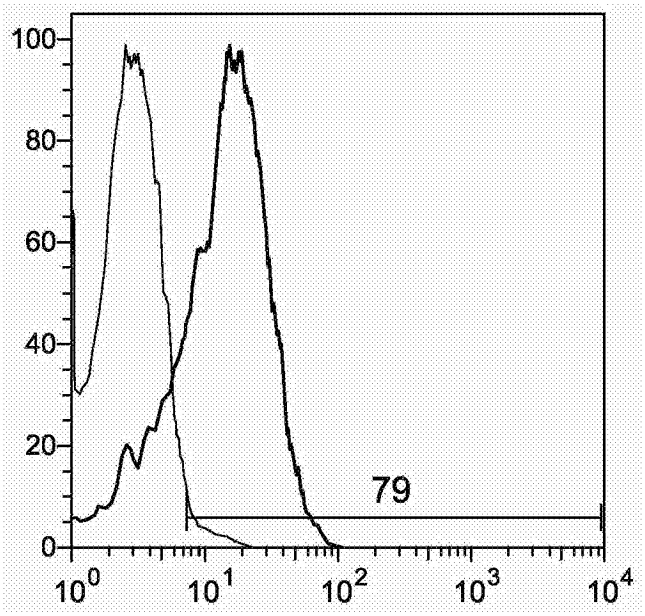

100
80
60
40
20
0
79
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

图14c

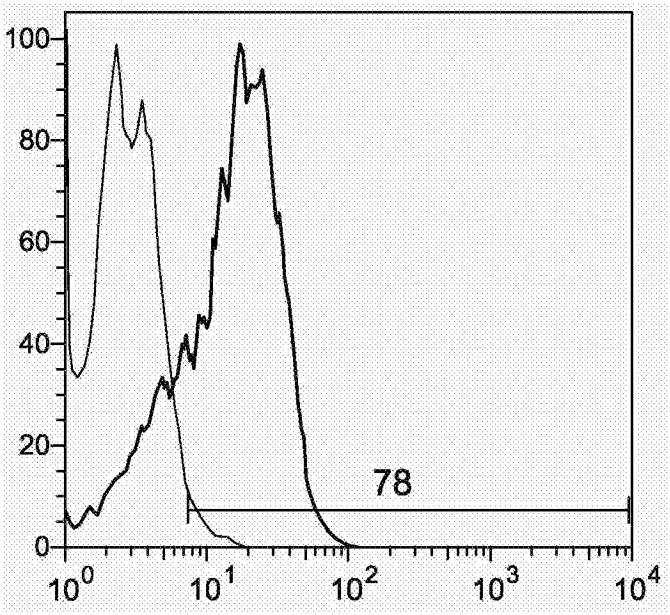

100
80
60
40
20
0
78
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

图14d

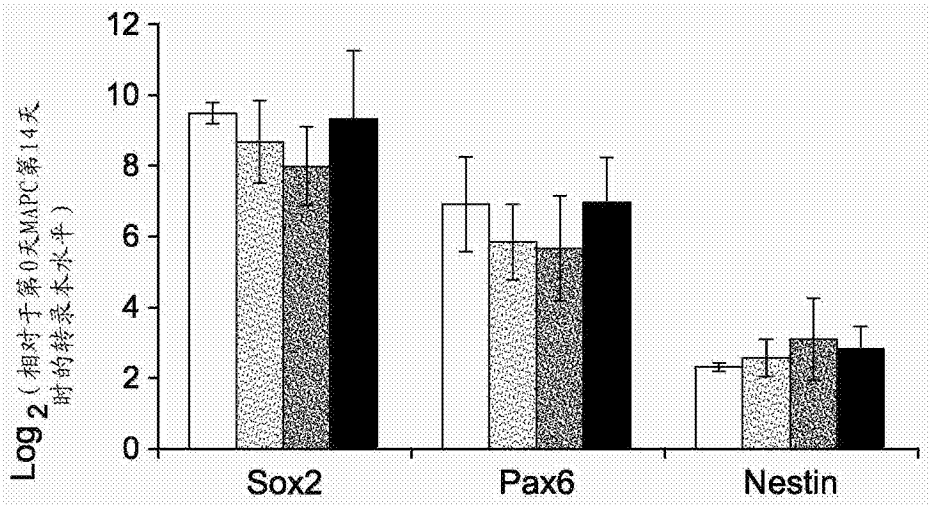

12
10
8
6
4
2
0
Log 2（相对于第0天MAPC第14天时的转录本水平）
Sox2
Pax6
Nestin

图15a

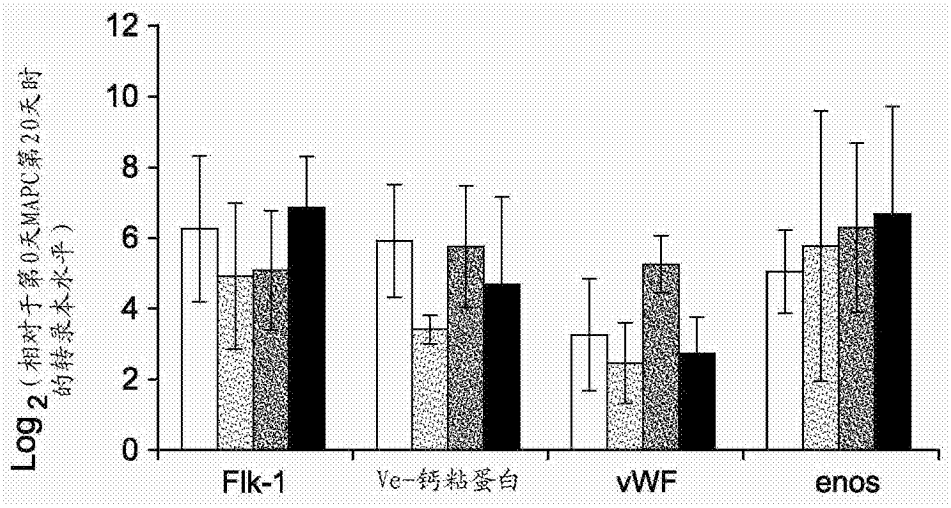

12
10
8
6
4
2
0
Log 2（相对于第0天MAPC第20天时的转录本水平）
Flk-1
Ve-钙粘蛋白
vWF
enos

图15b

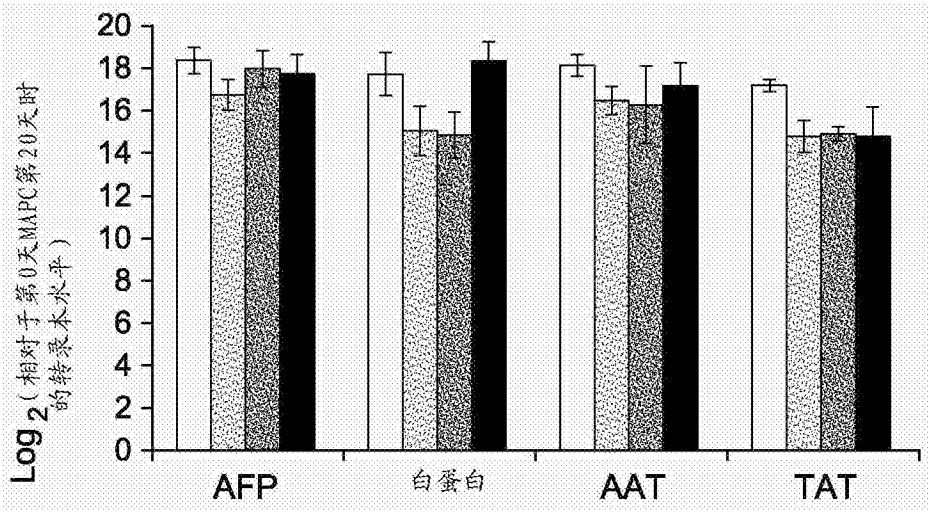

20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Log2(相对于第0天MAPC第20天时的转录本水平)
AFP
白蛋白
AAT
TAT

图15c

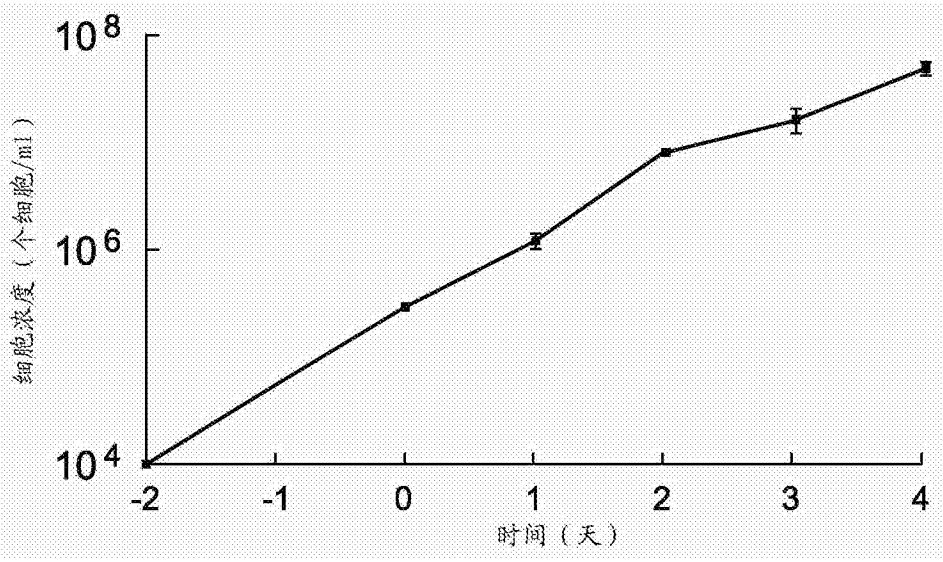

10^8
10^6
10^4
细胞浓度（个细胞/ml）
-2
-1
0
1
2
3
4
时间（天）

图16a

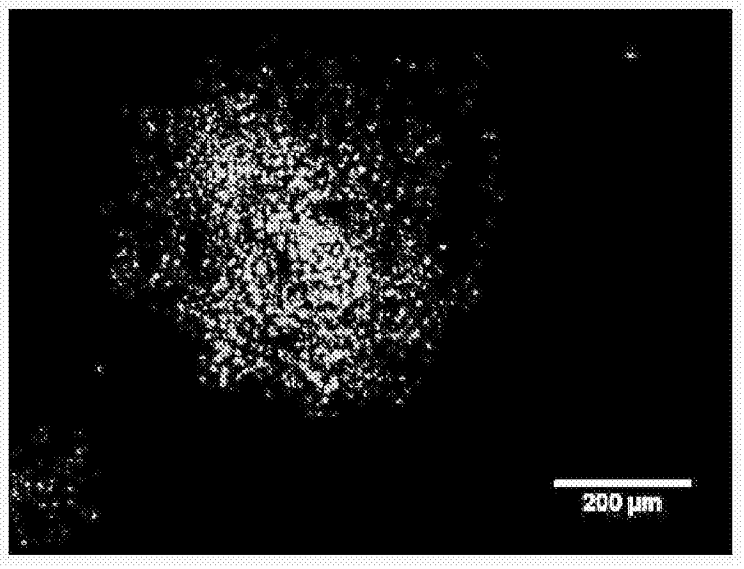

200 μm

图16b

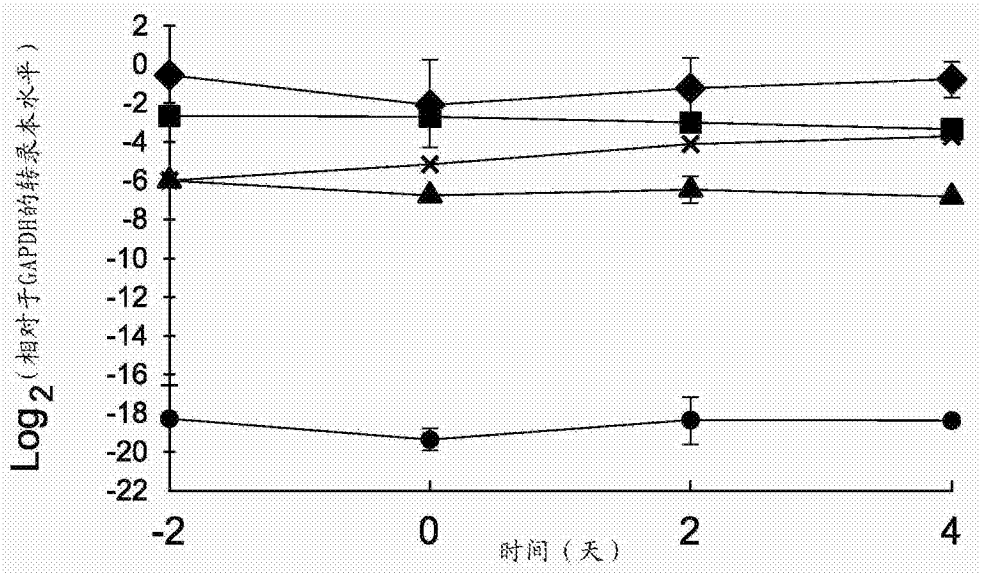

Log2（相对于GAPDH的转录本水平）
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
-20
-22
-2
0
2
4
时间（天）

图16c

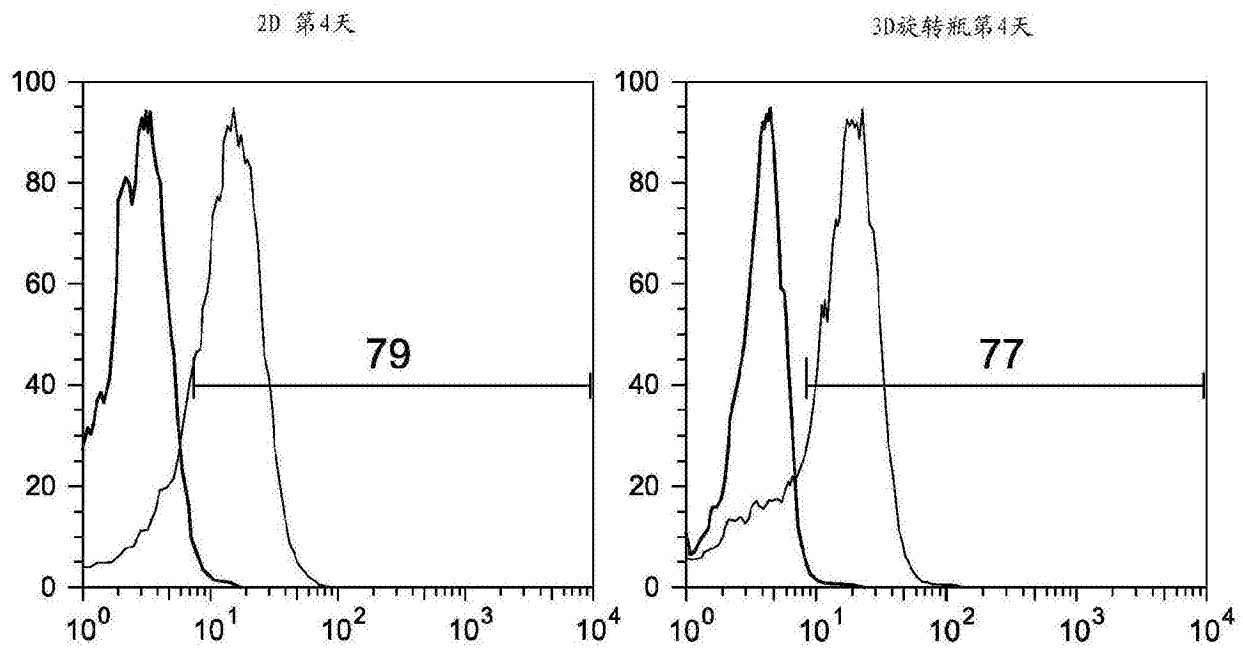

2D 第4天
3D旋转瓶第4天
79
77
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

图16d

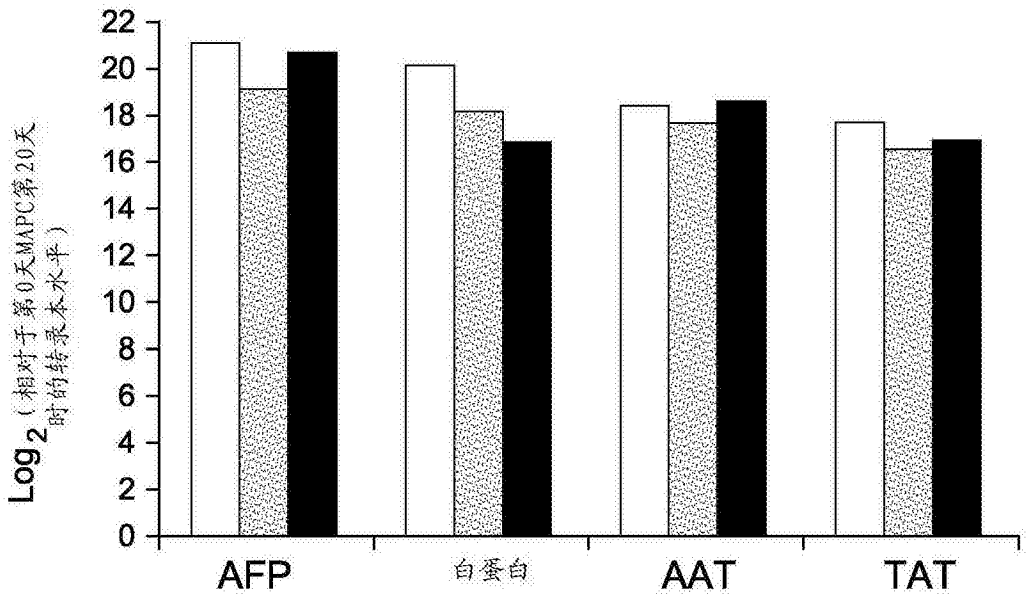

Log_2（相对于第0天MAPC第20天时的转录本水平）
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
AFP
白蛋白
AAT
TAT

图16e

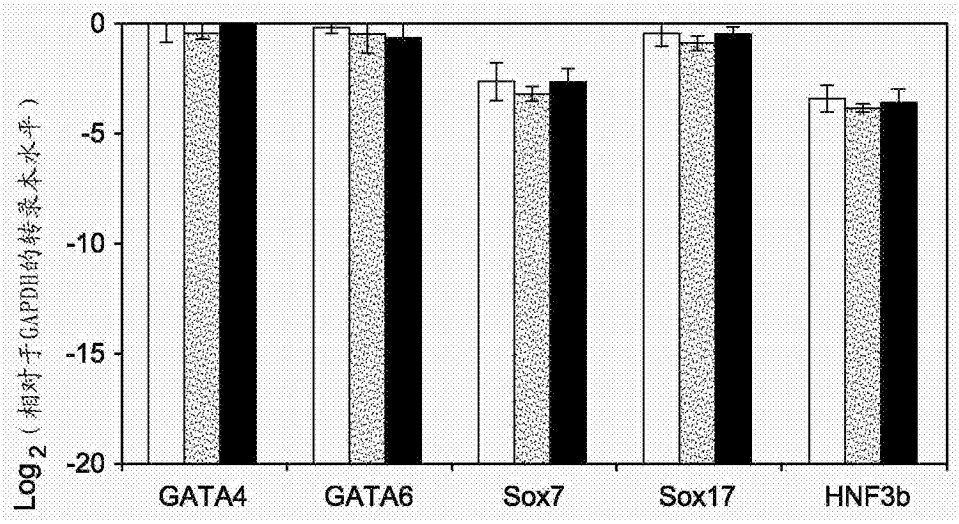

0
-5
-10
-15
-20
Log2（相对于GAPDH的转录本水平）
GATA4
GATA6
Sox7
Sox17
HNF3b

图17

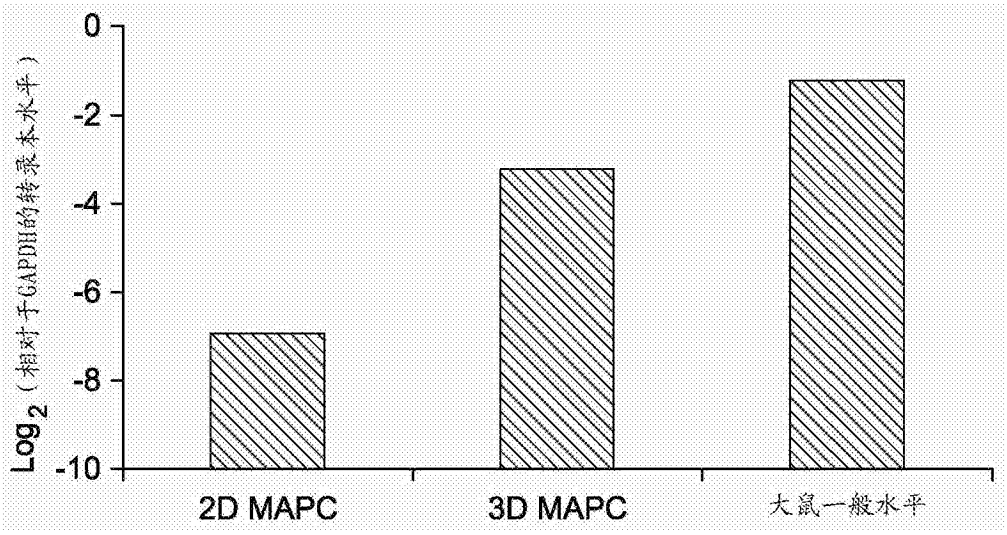

0
-2
-4
-6
-8
-10
Log2（相对于GAPDH的转录本水平）
2D MAPC
3D MAPC
大鼠一般水平

图18a

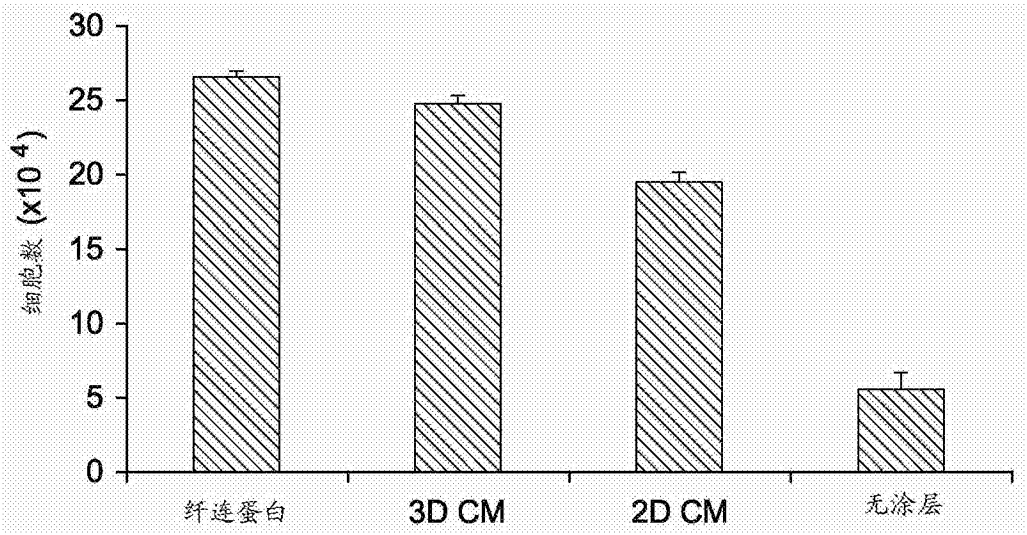

30
25
20
15
10
5
0
细胞数 (x10 4)
纤连蛋白
3D CM
2D CM
无涂层

图18b

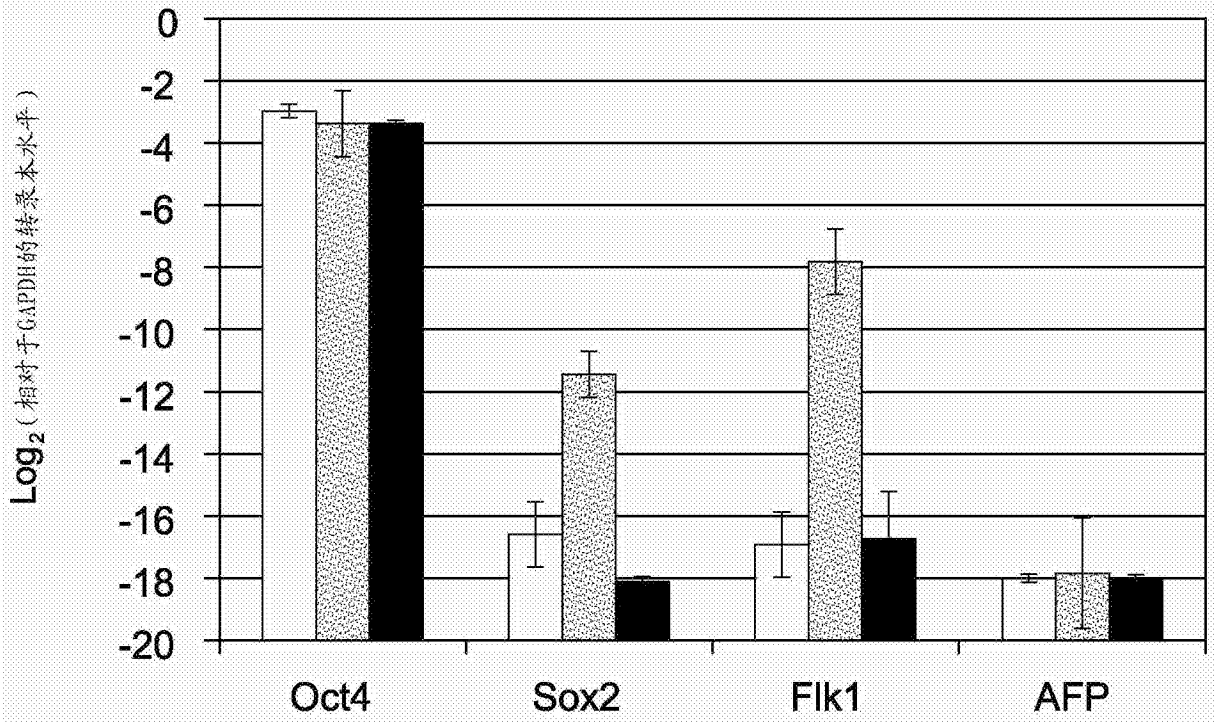

0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
-20
Log2(相对于GAPDH的转录本水平)
Oct4
Sox2
Flk1
AFP

图19a

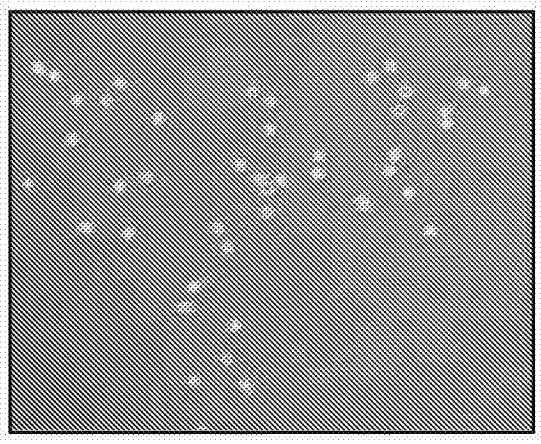


图19b

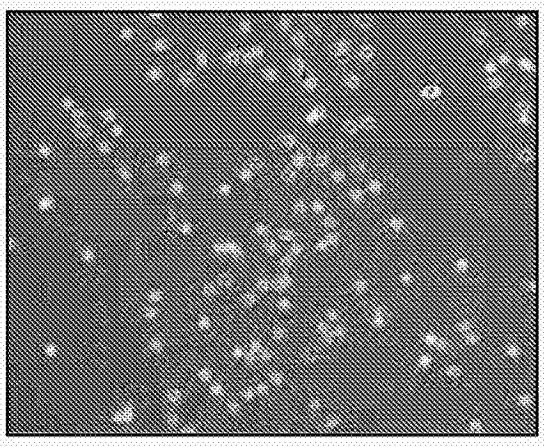


图19c

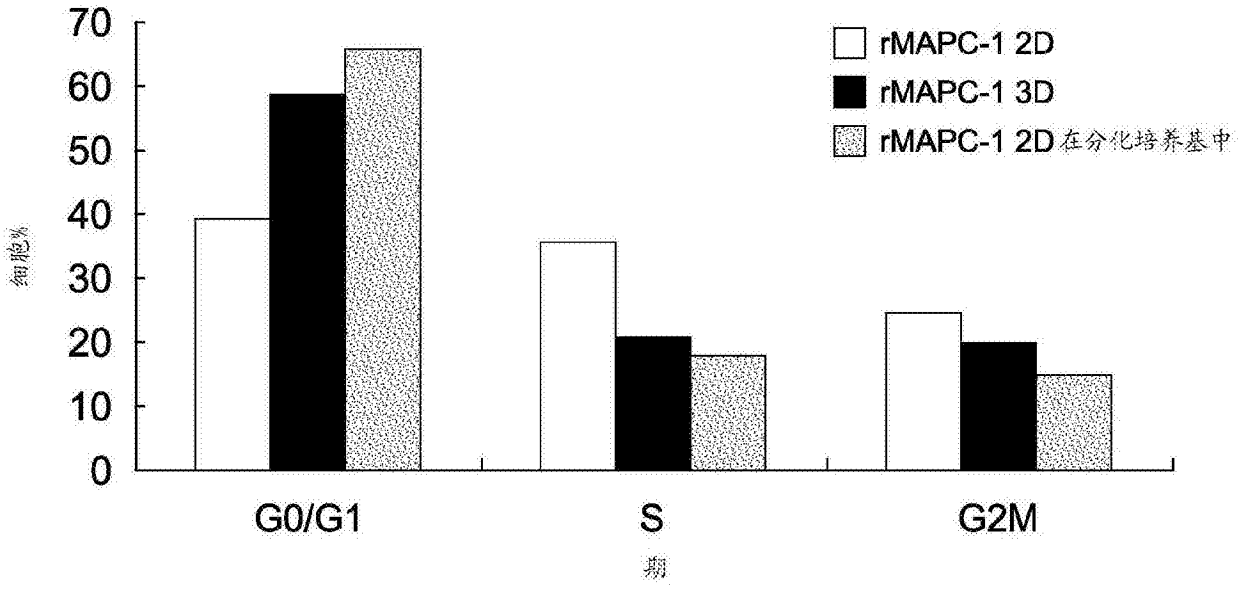

70
60
50
40
30
20
10
0
细胞%
rMAPC-1 2D
rMAPC-1 3D
rMAPC-1 2D在分化培养基中
G0/G1
S
G2M
期

图20

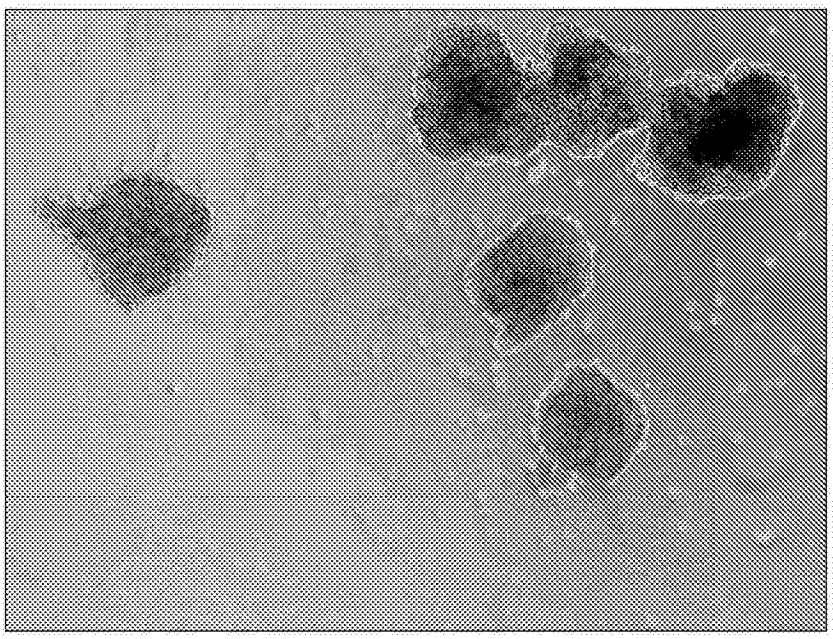


图21

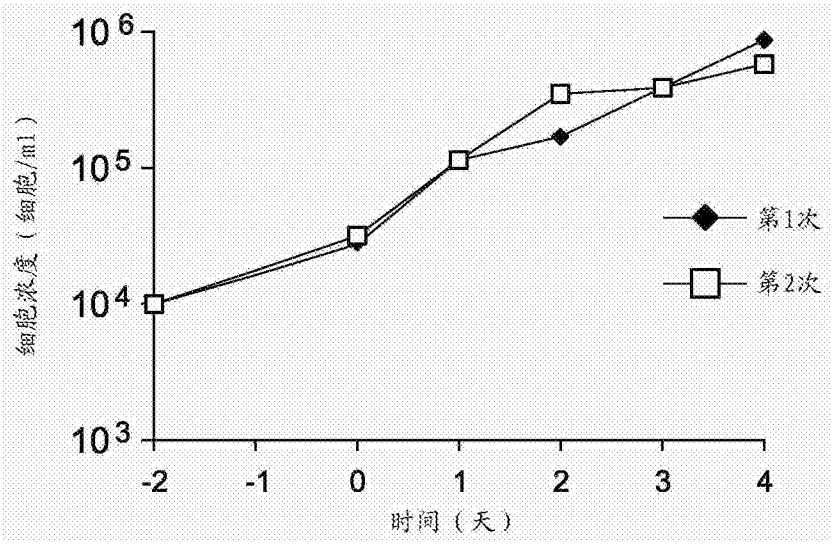

10^6
10^5
10^4
10^3
细胞浓度（细胞/ml）
-2
-1
0
1
2
3
4
时间（天）
第1次
第2次

图22a

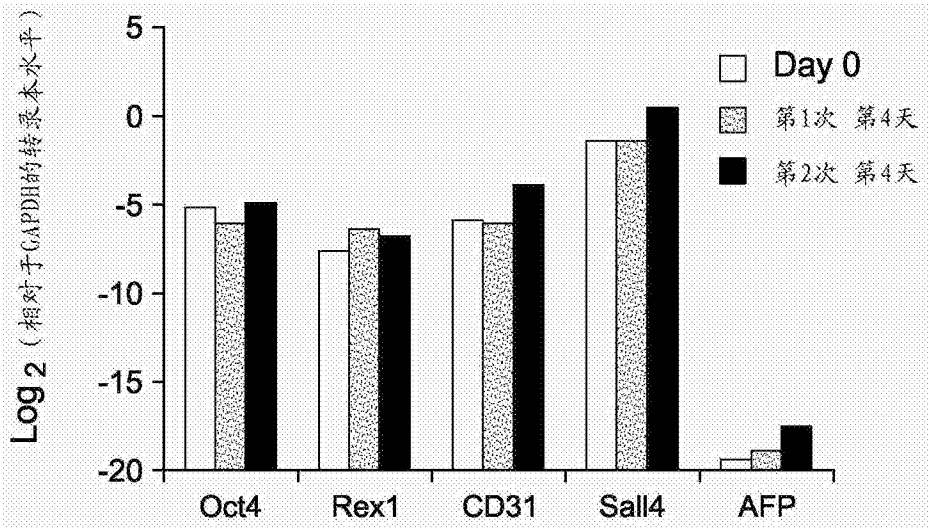

5
0
-5
-10
-15
-20
Log_2（相对于GAPDH的转录本水平）
Day 0
第1次 第4天
第2次 第4天
Oct4
Rex1
CD31
Sall4
AFP

图22b

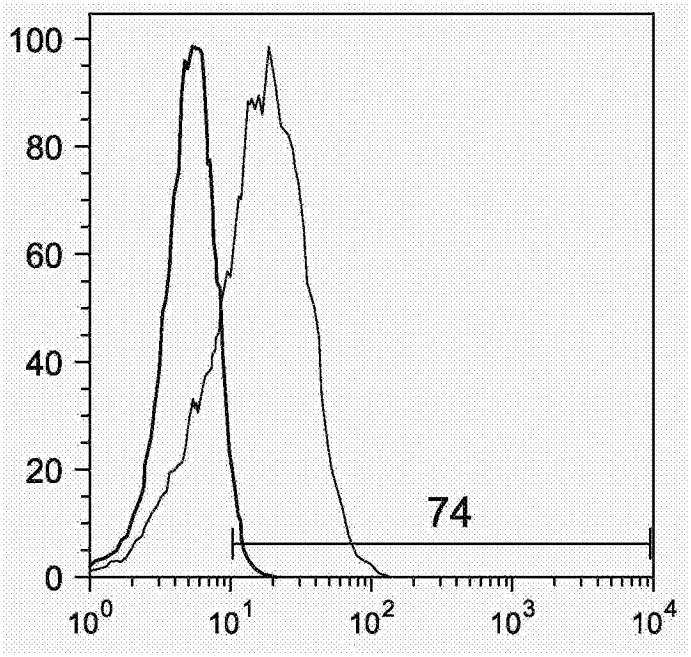


图22c