



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102858956 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201180020289. 8

(22) 申请日 2011. 02. 23

(30) 优先权数据

61/308, 103 2010. 02. 25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 10. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/025846 2011. 02. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/106365 EN 2011. 09. 01

(73) 专利权人 ABT 控股公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 J·M·沃达 A·E·廷 N·A·雷曼

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C12N 5/074(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2008274088 A1, 2008. 11. 06, 说明书第

13、48、77、86、89、90 段。

US 2008274088 A1, 2008. 11. 06, 说明书第
13、48、77、86、89、90 段。

US 2006003323 A1, 2006. 01. 05, 说明书第
764 段。

US 4303796 A, 1981. 12. 01, 说明书第 12 栏
第 36-59 行。

CN 101443049 A, 2009. 05. 27, 全文。

CN 101098882 A, 2008. 01. 02, 全文。

CN 1662548 A, 2005. 08. 31, 全文。

张晶 等. 心肌缺血中血管内皮生长因子的
临床研究述要.《中医药学刊》. 2005, 第 23 卷 (第
01 期), 115-116.

审查员 彭海航

权利要求书1页 说明书31页 附图14页

(54) 发明名称

血管生成的调节

(57) 摘要

本发明提供了治疗可以通过血管生成改善的病理状态的方法。本发明总体上涉及通过给予表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的细胞来提供血管生成。本发明还涉及药物发现方法来筛选可调节细胞表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的能力的试剂。本发明还涉及可以用来提供给予受试者的细胞的细胞库, 所述细胞库包括具有所需的一种或多种促血管生成因子的表达和 / 或分泌水平的细胞。

1. 具有所需的表达和 / 或分泌促血管生成因子效能的细胞用于制备在受试者中提供血管生成的药物的用途, 其中所述细胞是能够分化为内胚层、外胚层和中胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎干细胞、非生殖细胞, 所述促血管生成因子包括但不限于 VEGF、CXCL5 和 IL-8。

2. 权利要求 1 的用途, 其中, 在将所述细胞给予所述受试者之前, 测定所述细胞确定其具有这种效能。

3. 权利要求 2 的用途, 其中所述的细胞是同种异体的。

4. 权利要求 1-3 任一项的用途, 其中所述的受试者具有选自急性心肌梗塞、慢性心力衰竭、外周血管疾病、中风、慢性完全闭塞、肾脏缺血和急性肾损伤的病症。

5. 权利要求 4 的用途, 其中所述受试者为人。

6. 一种构建细胞库的方法, 所述方法包括扩增并储存用于将来给予受试者的具有所需的表达和 / 或分泌促血管生成因子效能的细胞, 其中所述细胞是能够分化为内胚层、外胚层和中胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎干细胞、非生殖细胞, 所述促血管生成因子包括但不限于 VEGF、CXCL5 和 IL-8。

7. 权利要求 6 的方法, 其中对所述细胞进行测定确定其具有所需的表达和 / 或分泌促血管生成因子的效能。

8. 一种药物发现方法, 所述方法包括将具有所需的表达和 / 或分泌促血管生成因子效能的细胞暴露于试剂以评估所述试剂对所述细胞表达和 / 或分泌促血管生成因子能力的效应, 所述细胞是能够分化为内胚层、外胚层和中胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎干细胞、非生殖细胞, 所述促血管生成因子包括但不限于 VEGF、CXCL5 和 IL-8, 其中所述试剂包括但不限于有机小分子、反义核酸、siRNA、DNA 适体、肽类、抗体、非抗体蛋白、细胞因子、趋化因子和化学引诱物。

9. 权利要求 8 的方法, 其中对所述细胞进行测定确定其具有所需的表达和 / 或分泌促血管生成因子的效能。

10. 一种包含能够分化为内胚层、外胚层和中胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎干细胞、非生殖细胞的组合物, 所述细胞以比亲代细胞群更高的水平分泌包括但不限于 VEGF、CXCL5 和 IL-8 的促血管生成因子。

11. 一种增强细胞中促血管生成因子表达的用于非治疗目的的方法, 所述方法包括将所述细胞暴露于 TNF- α 、IL-1 β 、和 IFN- γ 的结合物或前列腺素 F 类似物的结合物, 其中所述细胞是能够分化为内胚层、外胚层和中胚层中至少两种的细胞类型的非胚胎干细胞、非生殖细胞, 所述促血管生成因子包括但不限于 VEGF、CXCL5 和 IL-8。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述前列腺素 F 类似物是拉坦前列腺素。

血管生成的调节

技术领域

[0001] 本发明提供了治疗可以通过提供血管生成改善的病理状态的方法。本发明总体上涉及通过给予表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的细胞来提供血管生成。本发明还涉及药物发现方法来筛选可调节所述细胞表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的能力的试剂。本发明还涉及可以用来提供给予受试者的细胞的细胞库, 所述细胞库包括具有所需的一种或多种促血管生成因子的表达和 / 或分泌水平的细胞。本发明还涉及包括具有所需的一种或多种促血管生成因子特定表达和 / 或分泌水平的细胞的组合物, 例如药物组合物。本发明还涉及在将所述细胞给予要治疗的受试者之前实施的诊断方法, 包括用于评估待给予的细胞所需效能的测定。本发明进一步涉及治疗后诊断测定以评估所述细胞对被治疗的受试者的效果。所述细胞是非胚胎干细胞、非生殖细胞, 具有以下一个或多个特征: 在培养物中长期复制, 明确的长期复制的标志物, 例如端粒酶、多能性标志物, 和广泛的分化潜能, 无需转化(transformed)。

发明内容

[0002] 本发明广义上涉及提供血管生成的方法。

[0003] 本发明还涉及提供一种或多种促血管生成因子来提供血管生成的方法。

[0004] 促血管生成因子包括但不限于 FGF、VEGF、VEGFR、NRP-1、Ang1、Ang2、PDGF (BB- 同源二聚体)、PDGFR、TGF- β 、内皮糖蛋白、TGF- β 受体、MCP-1、整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、VE- 钙粘蛋白、CD31、肝配蛋白、纤溶酶原激活物、纤溶酶原激活物抑制因子 -1、eNOS、COX-2、AC133、Id2/Id3、血管生成素、HGF、Vegf、Il-1 α 、Il-8、Il-6、Cxc15、Fgf α 、Fgf β 、Tgf α 、Tgf β 、MMP (包括 mmp9)、纤溶酶原激活物抑制因子 -1、血小板反应素、血管生成素 1、血管生成素 2、双调蛋白、瘦蛋白、内皮素 -1、AAMP、AGGF1、AMOT、ANGLPTL3、ANGPTL4、BTG1、IL-1 β 、NOS3、TNFSF12 和 VASH2。

[0005] 根据本发明, 提供血管生成可以通过给予天然 (即非重组地) 表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的细胞或所述细胞的条件培养基来实现。细胞包括但不限于非胚胎干细胞且非生殖细胞的细胞, 其具有某些胚胎干细胞的特征, 但来源于非胚胎组织, 并表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子。所述细胞可以天然表达 / 分泌一种或多种促血管生成因子 (即未经遗传或药物修饰以激活表达和 / 或分泌)。但是, 天然表达子可以经遗传或药物修饰以增强效能。

[0006] 所述细胞可以表达多能性标志物, 例如 oct4。它们还可以表达与长期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、内胚层和中胚层的两种或三种的胚胎胚层, 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, 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、外胚层和中胚层胚胎细胞谱系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,通过阻止细胞增殖形成肿瘤的处理,这种细胞可以是缺陷的,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。

[0007] 细胞包括但不限于以下编号的实施方案:

[0008] 1. 分离的扩增的非胚胎干细胞、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。

[0009] 2. 如以上 1 所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞,其进一步表达端粒酶、rex-1、rox-1 或 sox-2 中的一种或多种。

[0010] 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、外胚层和中胚层胚胎细胞谱系的至少两个谱系中的至少一种细胞类型。

[0011] 4. 如以上 3 所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞,其进一步表达端粒酶、rex-1、rox-1 或 sox-2 中的一种或多种。

[0012] 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、外胚层和中胚层胚胎细胞谱系的每个的至少一种细胞类型。

[0013] 6. 如以上 5 所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞,其进一步表达端粒酶、rex-1、rox-1 或 sox-2 中的一种或多种。

[0014] 7. 分离的扩增的非胚胎干细胞、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。

[0015] 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。

[0016] 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、外胚层和中胚层胚胎细胞谱系的至少两个中的至少一种细胞类型。

[0017] 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。

[0018] 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、外胚层和中胚层胚胎细胞谱系的每个的至少一种细胞类型。

[0019] 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。

[0020] 13. 分离的扩增的非胚胎干细胞、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。

[0021] 14. 如以上 13 所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞,其进一步表达 oct4、rex-1、rox-1、或 sox-2 中的一种或多种。

[0022] 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、外胚层和中胚层胚胎细胞谱系的至少两个中的至少一种细胞类型。

[0023] 16. 如以上 15 所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞,其进一步表达 oct4、rex-1、rox-1、或 sox-2 中的一种或多种。

[0024] 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、外胚层和

中胚层胚胎细胞谱系的每个的至少一种细胞类型。

[0025] 18. 如以上 17 所述的非胚胎干细胞、非生殖细胞,其进一步表达 oct4、rex-1、rox-1、或 sox-2 中的一种或多种。

[0026] 19. 分离的扩增的非胚胎干细胞、非生殖细胞,其可以分化为内胚层、外胚层和中胚层胚胎细胞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。

[0027] 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。

[0028] 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、外胚层和中胚层胚胎细胞谱系的每个的至少一种细胞类型。

[0029] 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。

[0030] 在一个实施方案中,所述受试者是人。

[0031] 所述的表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的细胞可以用于药物发现方法,来筛选可调节所述细胞表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子以便能提供血管生成的能力的试剂。所述试剂包括但不限于有机小分子、反义核酸、siRNA、DNA 适体、肽类、抗体、非抗体蛋白、细胞因子、趋化因子和化学引诱物。

[0032] 在一个具体例证的实施方案中,通过将细胞暴露于 TNF- α 、IL-1 β 、和 IFN- γ 的结合物而增强了效能。在其他实施方案中,这些组分中的任一种都可以单独使用。在进一步的实施方案中,可以使用其他促炎症分子,包括但不限于其他的白细胞介素或干扰素,例如 IL1- α 、IL-6、TGF- β 、GM-CSF、IL11、IL12、IL17、IL18、IL8、tol1 样受体配体包括 LPS、Poly(1:C)、CPGN-ODN 和酵母聚糖。在另一个具体例证的实施方案中,通过将所述细胞暴露于拉坦前列腺素(一种前列腺素 F 的类似物)而增强了效能。在另一个实施方案中,所述细胞可以暴露于前列腺素 F、任意其他的前列腺素 F2 α 受体类似物、E 型前列腺素或类似物。

[0033] 由于本申请中描述的血管生成效果可以由分泌的因子引起,所以不只所述细胞,产自培养所述细胞的条件培养基(或其提取物)也可以用于实现所述的效果。所述培养基会含有分泌的因子,因此可以用于代替所述细胞或加入到所述细胞中。因此,在所述细胞有用时,应该认为条件培养基(或其提取物)也是有效的并可以被替代或加入。

[0034] 鉴于所述细胞可以实现血管生成效果的性质,可以建立细胞库,其包括选择的具有表达和分泌一种或多种促血管生成因子以便提供血管生成的所需效能的细胞。因此,本发明包括测定细胞表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的能力以及将具有所需效能的细胞加入细胞库。细胞库可提供制备给予受试者的药物组合物的来源。可以从库中直接使用细胞或在使用前扩增细胞。特别是在所述细胞被进一步扩增的情况下,在扩增后需要验证细胞仍然具有所需的效能。细胞库允许对受试者来说是同种异体的细胞的“现成”使用。

[0035] 因此,本发明还涉及在将所述细胞给予受试者之前实施的诊断方法。所述方法包括评估所述细胞表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子以便能够提供血管生成的效能。所述细胞可以取自细胞库并直接使用或在给予前扩增。在两种情况下,均可以就所需效能评估所述细胞。特别是在所述细胞被进一步扩增的情况下,在扩增后需要验证细胞仍

然具有所需的效能。或者,所述细胞可以来源于受试者并在给予前扩增。在这种情况下,可以在给予回受试者(自体的)之前就所需效能评估所述细胞。

[0036] 虽然选择用来表达一种或多种促血管生成因子的细胞在选择程序中需要进行测定,但是在给予受试者以治疗之前再次测定细胞以确认细胞仍然能够表达所需水平的因子是优选的和谨慎的。这在所述表达者细胞已被扩增或储存一段时间如储存在细胞库中的情况下是特别优选的,在细胞库中细胞在储存期间很可能被冷冻。

[0037] 关于用表达 / 分泌一种或多种促血管生成因子的细胞进行治疗的方法,在所述细胞的最初分离和给予受试者之间,可以多次(即相继)进行因子表达的测定。这是为确保所述细胞在这段时间范围内发生的操作后仍然表达 / 分泌所述的一种或多种促血管生成因子。例如,可在所述细胞的每次扩增之后进行测定。如果细胞储存于细胞库中,它们可在被从存储中取出后进行测定。如果它们被冷冻,则可在解冻后对它们进行测定。如果来自细胞库的细胞被扩增,可在扩增之后对它们进行测定。优选地,可对最终细胞制品(即实际给予所述受试者的细胞制品)的一部分进行测定。

[0038] 本发明进一步包括在给予所述细胞之后的治疗后诊断测定,以评估功效。该诊断测定包括但不限于依据临床症状、形态学(例如血管的存在情况)或依据一种或多种血管生成生物标志物的血管生成分析。

[0039] 本发明还涉及通过评估所述细胞表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子以便提供血管生成的效能来确定所述细胞用量的方法。在这种情况下,应测定所述效能并相应地调整所述用量。

[0040] 效能可以通过测量所述细胞因子本身的量来评估。其还可以通过测定因子提供的效果,例如体内或体外血管生成,来评估。

[0041] 本发明还涉及包括具有所需效能,特别是表达和 / 或分泌所需数量的一种或多种促血管生成因子,的细胞群体的组合物。这些细胞群体可以作为适合给予受试者的药物组合物和 / 或在细胞库中,在细胞库中细胞可以用于直接给予受试者或在给予前扩增。在一个实施方案中,所述细胞相比之前的(亲代的)细胞群体具有增强的(增加的)效能。亲代细胞如本文所定义。可以通过选择天然表达者或通过作用于所述细胞的外部因子来实现增强。

[0042] 本发明所述的方法和组合物可以用于治疗血管生成对其有益的任何疾病。这包括但不限于任何的缺血病症,例如急性心肌梗塞、慢性心力衰竭、外周血管疾病、中风、慢性完全闭塞、肾脏缺血和急性肾损伤。

[0043] 对于这些治疗,可以给予表达所述一种或多种促血管生成因子的细胞。所述细胞已经就其表达和 / 或分泌的因子的量进行了评估,并且就所述因子的所需表达和 / 或分泌量进行了选择。

[0044] 应理解,对任意上述疾病的治疗,使用所述细胞是方便的;也就是说,所述细胞已经就因子表达和 / 或分泌进行了评估并在给予以治疗病症前就所需水平的表达和 / 或分泌进行了选择。

附图说明

[0045] 图 1-MultiStem 在体外诱导血管生成并分泌多种促血管生成因子(A)。由培养

HUVEC 的 MultiStem 条件培养基(CM)诱导的体外血管生成的照片。(B) 在每种条件下每个视野形成的管的平均数。(C) 以 MultiStem 第 4 天条件培养基孵育的血管生成抗体阵列。VEGF、IL-8 和 CXCL5 是由 MultiStem 分泌的。在来自 4 个独立培养的 3 天耗尽培养基中 CXCL5(D)、VEGF(E) 和 IL-8(F) 的蛋白浓度显示 MultiStem 在标准培养条件下连续地表达这些蛋白。

[0046] 图 2-VEGF 对于 MultiStem 诱导血管生成是必需的。从条件培养基移除 VEGF 可阻止血管生成 (A) 完全 VEGF 免疫耗竭和抗体特异性,而 IL-8(B) 和 CXCL5(C) 水平不受影响。(D、E) VEGF 的免疫耗竭可降低了由 MultiStem 条件培养基诱导的血管生成。需要加入至少 250pg/ml 的 VEGF165 或 50pg/ml 的 VEGF121 以恢复某些水平的血管生成,但二者均未完全恢复活性。

[0047] 图 3-IL-8 对于 MultiStem 诱导血管生成是必需的。条件培养基中 IL-8 的免疫耗竭降低了血管生成,但是在基础培养基中加入 IL-8 不足以诱导血管生成。(A) 将 HUVEC 细胞与 (a) 内皮生长因子培养基(EGM)、(b) 无血清基础 MultiStem 培养基、(c) 4 天的无血清 MultiStemCM、(d) 兔 IgG 同种型对照和 (e) 4 天的 IL-8 免疫耗竭的无血清 MultiStem CM 孵育 18 小时。(B) IL-8 通过免疫耗竭降低 (C、D) VEGF, CXCL5 水平没有改变。

[0048] 图 4-CXCL5 对于 MultiStem 诱导的血管生成是必需的。但是,IL-8 和 CXCL5 不足以引发血管生成。(A) 将 HUVEC 细胞与 (a) 内皮生长因子培养基(EGM)、(b) EGM+IgG 同种型对照、(c) EGM+10ug/ml CXCL5 中和抗体、(d) 无血清基础 MultiStem 培养基、(e) 仅 4 天的无血清 MultiStem 条件培养基 (CM)、(f) CM+IgG 同种型对照、(g) CM+CXCL5 中和抗体 (10ug/ml) 孵育 18 小时。将 (B、C) IL-8(4000pg/ml) 或 CXCL5(150pg/ml) 单独或与 MultiStem 基础培养基一起加入不足以诱导血管生成。

[0049] 图 5- 不像 MultiStem, MSC 不会在体外诱导血管生成。(A) 体外血管生成测定显示了 MSC 和 MultiStem 条件培养基(CM)对内皮细胞管形成的效果上的不同。(B) 来自体外血管生成测定的照片显示了 MSC 和 MultiStem CM 在 6 小时和 24 小时后对内皮细胞管形成的效果。(C-E) 由 MSC 和 MultiStem 分泌的 CXCL5、VEGF 和 IL-8 的浓度。

[0050] 图 6-MultiStem 和 MSC 具有不同的分泌谱。在血管生成特异性抗体阵列上对从相同供体(分析了 3 个供体样本组)获得的 MSC 和 MultiStem 的条件培养基进行分析。(A) 显影的膜的照片显示了 MultiStem 的分泌谱与来自其他供体的 MultiStem 相似,但与 MSC,甚至来自相同供体的 MSC,相比有显著不同。(B) 对所述阵列的半定量分析显示了 MSC 与 MultiStem 相比不同的分泌谱,包括仅 MultiStem 表达的 IL-8。数据表示为平均点强度,为阳性对照的百分数,归一化回总蛋白含量。

[0051] 图 7- 在体外用 Cytomix 处理 MultiStem 增加了促血管生成分子的表达。将 MultiStem 培养 3 天,然后用 Cytomix(10ng/mL TNF- α , IL-1 β 和 IFN γ)处理 24、48、72 小时。随后收集细胞,用于 RT-PCR 分析促血管生成基因的表达。在用 Cytomix 处理后 CXCL5、FGF2 和 HGF 基因表达都增加超过了基准线。另外,在这些条件下 IL-8 也增加。

[0052] 图 8- 微阵列分析也显示用 Cytomix 处理(48 小时)的 MultiStem 中血管生成基因表达上调。该图显示了血管生成因子被调节的样品。微阵列分析显示了用 Cytomix 处理 6 或 48 小时的 MultiStem 中促血管生成因子的增加。在 Illumina 微阵列芯片(HumanHT-12_V4)上分析了来自用 Cytomix 处理的 MultiStem (每时间点 n=6)或未处理的 MultiStem (每

时间点 n=6) 的 RNA。检测了两个 MultiStem 细胞库。该图给出了促血管生成基因上调的样品的倍数增加的例子。需要通过 qPCR 作进一步确认, 该工作正在进行。

[0053] 图 9- 在 HUVEC 细胞管形成测定中, Cytomix 处理增强了 MultiStem 的血管生成效能。该图显示了血管生成评分。在 HUVEC 细胞管形成测定中, 用 Cytomix 处理 MultiStem 增加了血管生成。三天后从细胞收集的无血清条件培养基显示, 尽管来自未处理的 MultiStem 的条件培养基给出强的 HUVEC 管形成, 用 Cytomix 处理细胞导致了血管生成效能的增强。来自 Lonza MSC 的无血清条件培养基没有诱导显著的 HUVEC 管形成。对 MSC 的处理只轻微增加了血管生成效能。EGM = 内皮生长培养基(阳性对照)。EBM = 无血清基础内皮培养基(阴性对照)。

[0054] 图 10A-C- 用前列腺素 F 或拉坦前列素(前列腺素 F 类似物)预处理 MultiStem 在体外增加了 MultiStem 的血管生成因子表达。用前列腺素 F 类似物拉坦前列素处理 MultiStem 也增加了所述促血管生成因子的表达。将 MultiStem 用一个剂量范围的拉坦前列素处理 24、48 或 72 小时。然后, 用 RT-PCR 分析促血管生成因子的基因表达。KITLG (A)、HGF 和 VEGF (B) 以及 IL-8 (C) 的基因表达都增加。生物的前列腺素 F 也增加了 VEGF A 水平 (B)。

[0055] 图 11-HUVEC 管形成测定用来检验拉坦前列素 (1 μ M) 处理的 MultiStem 的血管生成能力。与使用来自未处理细胞的条件培养基相比, 使用来自拉坦前列素处理细胞的条件培养基的 HUVEC 管形成适度地增加。在第三天从单独培养的 MultiStem 或存在拉坦前列素 (1 μ M) 下培养的 MultiStem 收集无血清培养基。基础培养基或加入拉坦前列素的基础培养基不会诱导显著的管形成。相比之下, 来自未处理细胞的条件培养基单独或在收集后在培养基加入拉坦前列素 (1 μ M), 诱导了相等水平的血管生成。该体外测定中测量显示, 收集自用拉坦前列素处理三天的细胞的无血清条件培养基适度地增加了血管生成能力。EGM 和含血清 MultiStem 培养基作为阳性对照。EBM 和基础无血清培养基为阴性对照。

[0056] 图 12- 体外血管生成分析可以用来检验不同细胞批和处理方法的效能。使用 HUVEC 管形成测定对血管生成能力进行测量可以用来评估来自不同细胞批(解冻 a-f) 或不同处理条件(解冻 -f 相对对 24 小时 A-F) 的细胞的功能效能。

具体实施方式

[0057] 应该理解, 本发明不受本文所述的具体操作、方法和试剂等限制, 这些可以变化。本文使用的术语只为描述具体的实施方案, 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书限定。

[0058] 本文使用的段落标题仅仅作为组织目的, 而不应被解释为任何形式的对所述主题的限制。

[0059] 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申请中引用和论述的多种综合及专业参考文献执行。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) and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

[0060] 定义

[0061] “一”或“一个”在本文中是指一个或多个；至少一个。当本文中使用时，通常包括单数形式。

[0062] “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，其中的细胞已就一种或多种促血管生成因子增强表达进行了选择。在从储存释放后，给予所述受试者之前，优选再次测定细胞的效能，即一种或多种促血管生成因子的表达水平。这可以使用本申请描述的或本领域已知的任何直接的或间接的测定来完成。然后，具有需要的效能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。

[0063] “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。

[0064] 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”的同义词并具有相同的含义。

[0065] “包括”是“包含”的同义词（见上）。

[0066] “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。在本文中，这是指将所述细胞培养足够的时间以分泌能够有效达到本申请描述的任何效果的因子，所述效果包括提供血管生成或提供一种或多种促血管生成因子。

[0067] 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。出于本发明的目的，可培养细胞历经足够数量的细胞分裂以产生有效量的所述因子，使得所述培养基具有所述效果，其包括提供血管生成或提供一种多种促血管生成因子。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（例如通过连接标志物的抗体和磁性柱）和 FACS 分选。

[0068] “EC 细胞”是从被称为畸胎瘤的癌症类型的分析中发现的。1964 年，研究人员注意到畸胎瘤中的单个细胞可被分离并在培养物中保持不分化。这种类型的干细胞被称为胚胎癌细胞（EC 细胞，embryonic carcinoma cell）。

[0069] “有效量”通常指由提供血管生成产生的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

考虑确定给予受试者的有效量。当用于本文时,涉及治疗的“有效剂量”与“有效量”意义相同。

[0070] “有效途径”通常是指提供用于将一种试剂递送至所需腔室、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。

[0071] “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。

[0072] 使用术语“包括”并非意图进行限制。

[0073] “增加”意指完全地诱导一个生物学事件或增加所述事件的程度。

[0074] “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); 以及 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。

[0075] 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。

[0076] 然而,本文所用的术语“分离的”不表示仅胚胎干细胞的存在情况。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。这还可用于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、胎盘、脐带、脐带血、脂肪组织等)中的原始数量被富集。

[0077] “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。

[0078] 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。

[0079] 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, 30 896-904(2002); and (Jiang, Y. et al., Nature, 418:41-9. (2002))。

[0080] 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。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。

[0081] “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。

[0082] 术语“效能”是指细胞(或者来自所述细胞的条件培养基)实现本申请描述的各种效果的有效性的程度。因此,效能是指各种水平的效果,包括但不限于:(1) 提供血管生成;(2) 表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子;或者 (3) 治疗与血管生成不足相关的临床症状以减少(包括预防)所述症状。

[0083] 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。

[0084] “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。

[0085] 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,其最终结果是改善血管生成不足的有害效应。

[0086] “选择”具有所需水平的效能(例如,表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子)的细胞可以指鉴别(如通过测定)、分离和扩增细胞。这能够产生具有比所述细胞分离自的亲代细胞群更高效能的细胞群。“亲代”细胞群是指选择的细胞从其分裂的亲代细胞。“亲代”是指实际的 P1 → F1 关系(即,子代细胞)。因此,如果细胞 X 是从细胞 X 和 Y 的混合群落(其中 X 是表达子而 Y 不是)中分离的,则人们不会把纯的 X 分离物分类为具有增强的表达。但是,如果 X 的子代细胞是更高表达子,则人们可把所述子代细胞归类为具有增强的表

达。

[0087] 为选择表达所述一种或多种促血管生成因子的细胞,将会包括测定是否表达 / 分泌所述一种或多种促血管生成因子的测定,还包括获得所述表达子细胞。所述表达子细胞可以天然地表达一种或多种促血管生成因子,因为所述细胞不表达通过重组方式的所述因子。但是,表达子可以通过与增加因子表达的试剂孵育或暴露于该试剂而改进。在进行所述测定前,可以不知道从中选择所述表达子细胞的细胞群是否表达所述的一种或多种促血管生成因子。

[0088] 选择可以来自组织中的细胞。例如,在这种情况下,细胞将从所需的组织中分离、在培养基中扩增、选择用于表达 / 分泌一种或多种促血管生成因子,并对选择的细胞进一步扩增。

[0089] 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,对培养物中的所述一个或多个细胞测定一种或多种促血管生成因子的表达 / 分泌,并且获得的表达 / 分泌一种或多种促血管生成因子的细胞可以被进一步扩增。

[0090] 还可以就一种或多种促血管生成因子的表达 / 分泌增强选择细胞。在这种情况下,从中获得表达增强的细胞群可以已经表达 / 分泌所述一种或多种促血管生成因子。表达 / 分泌增强是指比亲代表达子细胞群更高量的每个细胞的一种或多种促血管生成因子(表达和 / 或分泌)。

[0091] 从中选择更高表达子的亲代细胞群可以是大体上同种的(相同细胞类型)。从这种细胞群获得高表达子的一种方式形成是形成单个的细胞或细胞池并测定这些细胞或细胞池的一种或多种促血管生成因子的表达 / 分泌来获得天然表达 / 分泌更高水平的一种或多种促血管生成因子(相对于用一种或多种促血管生成因子的诱导物处理细胞)的克隆,然后扩增为天然更高的表达子的细胞。

[0092] 但是,细胞可以用一种或多种可以增强所述因子的内源细胞基因的因子表达的试剂处理。因此,可以处理大体上同种的细胞群来增强表达。

[0093] 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 个在其中寻求表达增强的表达子细胞类型,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。

[0094] 因此,因子表达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促进因子表达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个细胞的平均因子表达或筛选出细胞群内没有故意处理就有高表达水平的细胞。然后,可以扩增这些细胞来提供较高(所需)表达的细胞群。

[0095] “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”。

[0096] “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)。

[0097] 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,例如畸胎瘤和一些其他来源,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。

[0098] “受试者”是指脊椎动物,例如哺乳动物,例如人。哺乳动物包括但不限于人、狗、猫、马、牛和猪。

[0099] 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试剂量。例如,有效的治疗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。这样的治疗有效量很容易地由本领域普通技术人员确定。因此,“治疗”是指送递这样的量。因此,治疗可以防止或改善血管生成不足的病理症状。

[0100] 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。

[0101] “验证”是指确认。在本发明的上下文中,确认一个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/确立具有有促血管生成活性的细胞实际上保持所述活性。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”。

[0102] 干细胞

[0103] 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。这些包括但不限于下文描述的那些细胞。

[0104] 胚胎干细胞

[0105] 研究最透彻的干细胞是胚胎干细胞(ESC),因为它具有无限的自我更新和多能分化潜能。这些细胞可以源自胚泡的内细胞团,或者可以源自植入后胚胎的原始生殖细胞(胚胎生殖细胞或EG细胞)。ES和EG细胞最初是从小鼠中得到,之后从很多不同的动物中得到,最近还从非人灵长类和人中得到。当ESC被导入小鼠胚泡或者其他动物的胚泡中时,ESC可以成为所述动物的所有组织。ES和EG细胞可通过用抗 SSEA1 (小鼠)和 SSEA4 (人)的抗体阳性染色来鉴别。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,用于阐述胚胎干细胞以及制备和扩增所述胚胎干细胞的方法。因此,ESC 及其分离和制备方法是本领域中公知的。

[0106] 已经鉴定了许多影响胚胎干细胞在体内的效能状态的转录因子和外源性细胞因

子。被描述涉及干细胞多能性的首个转录因子是 Oct4。Oct4 属于 POU(Pit-Oct-Unc)转录因子家族,是能够活化基因转录的 DNA 结合蛋白,在启动子或增强子区域内包含被称为“八聚体基序”的八聚序列。Oct4 在受精卵的分裂期时表达,直到卵圆柱形成。Oct3/4 的功能是抑制分化诱导基因(即,FoxaD3、hCG)、活化促进多能性的基因(FGF4、Utf1、Rex1)。Sox2——高迁移率族(high mobility group,HMG)框转录因子(box transcription factor)的一个成员——与 Oct4 协作活化内细胞团中表达的基因的转录。Oct3/4 在胚胎干细胞中的表达维持在某些水平之间是必要的。Oct4 表达水平 >50% 的过表达或者下调将改变胚胎干细胞命运,分别为形成原始内胚层 / 中胚层或滋养外胚层。在体内,Oct4 缺陷的胚胎可发育至胚泡期,但是内细胞团细胞不是多能的。相反,它们沿着胚胎外滋养层谱系分化。Sal14——一种哺乳动物 Spalt 转录因子——是 Oct4 的上调调节子,因此对于在胚胎早期维持合适的 Oct4 水平是重要的。当 Sal14 水平下降至低于某一阈值时,滋养外胚层细胞将异位扩增至内细胞团中。多能性所需要的另一个转录因子是 Nanog,是以 Celtic 部族“Tir Nan Og”:永远年轻的土地,命名的。在体内,Nanog 从致密桑葚胚期表达,之后被限制在内细胞团中,并且在植入期下调。Nanog 的下调对于在原肠胚形成过程中避免多能细胞的不受控扩增和允许多向分化可能是重要的。第 5.5 天分离的 Nanog 无效胚胎由无序胚泡构成,主要包含胚胎外内胚层和无法辨认的上胚层。

[0107] 非胚胎干细胞

[0108] 已在大部分组织中鉴别到干细胞。可能最清楚表征的是造血干细胞(HSC)。HSC 是来自中胚层的细胞,其可以使用细胞表面标志物和功能特性来纯化。它们已经被从骨髓、外周血、脐带血、胎肝和卵黄囊中分离到。它们起始造血作用并且产生多种造血谱系。当它们被移植进入致死量放射线照射的动物中时,它们能够再造红系嗜中性粒细胞 - 巨噬细胞(erythroid neutrophil-macrophage)、巨核细胞和淋巴造血细胞库。它们还能被诱导进行一些自我更新的细胞分裂。参见,例如,美国专利 No. 5,635,387、5,460,964、5,677,136、5,750,397、5,681,599 和 5,716,827。美国专利 No. 5,192,553 报道了用于分离人新生儿或胎儿造血细胞或祖细胞的方法。美国专利 No. 5,716,827 报道了作为 Thy-1⁺祖细胞的人造血细胞,以及在体外再生它们的合适生长培养基。美国专利 No. 5,635,387 报道了用于培养人造血细胞和它们的前体的方法和装置。美国专利 No. 6,015,554 描述了重建人淋巴和树突细胞的方法。因此,HSC 及其分离和扩增方法是本领域中公知的。

[0109] 本领域中公知的另一种干细胞是神经干细胞(NSC)。这些细胞可在体内增殖并且连续地再生至少一些神经细胞。当离体培养时,神经干细胞可被诱导增殖以及分化为不同类型的神经元和神经胶质细胞。当神经干细胞被移植至脑中时,其能够植入并且产生神经细胞和神经胶质细胞。参见,例如 Gage F.H., Science, 287:1433-1438 (2000), Svendsen S.N. et al, Brain Pathology, 9:499-513 (1999) 和 Okabe S. et al., Mech Development, 59:89-102 (1996)。美国专利 No. 5,851,832 报道了从脑组织中得到的多能神经干细胞。美国专利 No. 5,766,948 报道了由新生儿大脑半球产生神经母细胞。美国专利 No. 5,564,183 和 5,849,553 报道了哺乳动物神经嵴干细胞的用途。美国专利 No. 6,040,180 报道了在体外由哺乳动物多能 CNS 干细胞的培养物中产生分化的神经元。WO 98/50526 和 WO 99/01159 报道了神经上皮干细胞、少突星型胶质细胞前体和谱系受限的神经元前体的产生和分离。美国专利 No. 5,968,829 报道了从胚胎前脑得到的神经干细胞。因此,神经干

细胞以及制备和扩增它们的方法是本领域中公知的。

[0110] 本领域中已经大量研究的另一种干细胞是间充质干细胞(MSC)。MSC 来自于胚胎中胚层,可从多种来源分离到,主要包括成体骨髓、外周血、脂肪、胎盘和脐带血。MSC 能够分化成为很多中胚层组织,包括肌肉、骨、软骨、脂肪和腱。关于这些细胞有大量的文献。参见,例如,美国专利 No. 5,486,389、5,827,735、5,811,094、5,736,396、5,837,539、5,837,670 和 5,827,740。还可见于 Pittenger, M. et al., Science, 284:143-147(1999)。

[0111] 成体干细胞的另一个实例是脂肪来源的成体干细胞(ADSC),其通常已被通过以下方式从脂肪分离:吸脂术,之后使用胶原酶释放 ADSC。ADSC 在很多方面类似于源自骨髓的 MSC,不同的是能够从脂肪中分离更多细胞。已经报道这些细胞可以分化成为骨、脂肪、肌肉、软骨和神经元。U. S. 2005/0153442 描述了一种分离方法。

[0112] 本领域中已知的其他干细胞包括胃肠干细胞、表皮干细胞和肝脏干细胞,其也被称作“卵形细胞”(Potten, C., et al., Trans R Soc Lond B Biol Sci, 353:821-830(1998), Watt, F., Trans R Soc Lond B Biol Sci, 353:831(1997); Alison et al., Hepatology, 29:678-683(1998))。

[0113] 据报道能够分化成为超过一种胚胎胚层的细胞类型的其他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, K. E. et al., Stem Cells, 21:50-60(2003))、来自小胚胎样干细胞的细胞(Kucia, M. et al., J Physiol Pharmacol, 57 Suppl 5:5-18(2006))、来自羊水干细胞的细胞(Atala, A., J Tissue Regen Med, 1:83-96(2007))、来自皮肤来源的前体的细胞(Toma et al., Nat Cell Biol, 3:778-784(2001))和来自骨髓的细胞(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用于教导这些细胞。

[0114] 重编程体细胞的方法

[0115] 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。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, Nature, 441:1061-1067(2006) 和 Yamanaka, S., Cell Stem Cell, 1:39-49(2007))。

[0116] 核转移

[0117] 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,例如多莉羊(Wilmut et al., Nature, 385:810-813(1997))。通过 NT 产生活动物证明了体细胞的表现遗传状态(epigenetic state)(包括终末分化的细胞的表现遗传状态)尽管稳定,但也不是不可逆地固定的,而是可以重编程至胚胎状态,其能够指导新生物体的发育。除了为阐释胚胎发育和疾病中涉及的基本表现遗传机制提供令人兴奋的实验方法外,核克隆技术具有用于患者特异性移植医学的潜在益处。

[0118] 体细胞和胚胎干细胞的融合

[0119] 将体细胞核表观遗传重编程至未分化状态,已经在通过胚胎细胞和体细胞融合产生的鼠杂合体中被证明。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))。沉默多能性标志物例如 Oct4 的活化,或者失活体细胞 X 染色体的再活化为所述杂合细胞中体细胞基因组的重编程提供了分子证据。已经提出, DNA 复制对于在融合 2 天后首次观察到的多能性标志物的活化是必要的 (Do and Scholer, Stem Cells, 22:941-949(2004)),以及当与神经干细胞融合时, Nanog 在 ES 细胞中的强制过表达可促进多能性 (Silva et al., Nature, 441:997-1001(2006))。

[0120] 培养物诱导的重编程

[0121] 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, 295:1819(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maGSC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))。

[0122] 通过规定的转录因子进行重编程

[0123] Takahashi 和 Yamanaka 已经报道了将体细胞重编程回 ES 样状态 (Takahashi and Yamanaka, Cell, 126:663-676(2006))。在将 4 种转录因子 Oct4、Sox2、c-myc 和 Klf4 进行病毒介导的转导,之后针对 Oct4 靶基因 Fbx15 的活化进行选择之后,他们成功地将小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)和成体成纤维细胞重编程为多能 ES 样细胞(图 2A)。具有活化的 Fbx15 的细胞是制造的 iPS(诱导的多能干)细胞并且通过它们形成畸胎瘤的能力证明了它们是多能的,但是它们不能产生生活的嵌合体。这种多能状态依赖于转导的 Oct4 和 Sox2 基因的连续病毒表达,而内源 Oct4 和 Nanog 基因或者不表达,或者以比 ES 细胞中低的水平表达,并且发现它们各自的启动子大量甲基化。这与以下结论一致,即虽然 Fbx15-iPS 细胞与 ES 细胞并不一样,但是可能代表了重编程的不完全状态。尽管遗传实验已经确定了 Oct4 和 Sox2 对于多能性是必需的 (Chambers and Smith, Oncogene, 23:7150-7160(2004);Ivanona et al., Nature, 442:5330538(2006);Masui et al., Nat Cell Biol, 9:625-635(2007)),但是两种癌基因 c-myc 和 Klf4 在重编程中的作用仍较不清晰。这些癌基因中的一些实际上对于重编程来说可能不是必要的,因为已经在不存在 c-myc 转导的情况下得到了小鼠和人的 iPS 细胞,尽管效率较低 (Nakagawa et al., Nat Biotechnol, 26:191-106(2008);Werning et al., Nature, 448:318-324(2008);Yu et al., Science, 318:1917-1920(2007))。

[0124] MAPC

[0125] 人 MAPC 记载于美国专利 7,015,037。已经在其他哺乳动物中鉴定了 MAPC。例如,鼠 MAPC 也记载于美国专利 7,015,037。大鼠 MAPC 还描述于美国专利 No. 7,838,289。

[0126] 这些参考文献因记载了由 Catherine Verfaillie 首次分离的 MAPC 而以引用的方式纳入本文。

[0127] MAPC 的分离和培养

[0128] 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。

[0129] 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。

[0130] 美国专利 7.015.037 中描述的来自人骨髓的 MAPC

[0131] 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-A⁺细胞群,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-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。

[0132] 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。

[0133] 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 et al., 1978 (荧光激活细胞分选)记载。

[0134] 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。

[0135] 另外的培养方法

[0136] 在另外的实验中,培养 MAPC 的密度可以从约 100 个细胞/cm²或约 150 个细胞/cm²至约 10,000 个细胞/cm²变化,包括约 200 个细胞/cm²至约 1500 个细胞/cm²至约 2000 个细胞/cm²。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组的最佳密度。

[0137] 同样,在培养物中,在 MAPC 的分离、生长和分化期间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。

[0138] 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 Ficol1 梯度离心之后,将细胞以例如 250,000-500,000/cm²直接铺板。可以挑出贴壁集落,可以合并并且扩增。

[0139] 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/cm²的密度在 18% 血清和 3% 氧下(具有 PDGF 和 EGF)中铺板并传代。

[0140] 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。

[0141] 细胞培养物

[0142] 对于下文列出的全部组分,参见 U. S. 7,015,037,其以引用的方式纳入本文用于教导这些组分。

[0143] 一般来说,可以在本领域中公知并且可以得到的培养基中维持并且扩增可用于本发明的细胞。还考虑到了给细胞培养基补充哺乳动物血清。还可以有利地使用其他补充物来为所述细胞提供必需微量元素以实现最佳生长和扩增。还可以有利地将激素用于细胞培养物。还可以根据细胞类型和分化细胞的命运来使用脂质和脂质载体以补充细胞培养基。还考虑到了使用饲养细胞层。

[0144] 培养物中的细胞可维持在悬浮液中或贴壁于固体支持物,例如胞外基质成分。干细胞经常需要促进其附着于固体支持物的另外的因子,例如 I 型和 II 型胶原、硫酸软骨素、纤连蛋白、“超纤连蛋白(superfibronectin)”和纤连蛋白样聚合物、明胶、聚-D-和聚-L-赖氨酸、血小板反应蛋白和玻璃粘连蛋白。本发明的一个实施方案利用了纤连蛋白。参见,例如 Ohashi et al., Nature Medicine, 13:880-885(2007); Matsumoto et al., J Bioscience and Bioengineering, 105:350-354(2008); Kirouac et al., Cell Stem Cell, 3:369-381(2008); Chua et al., Biomaterials, 26:2537-2547(2005); Drobinskaya et al., Stem Cells, 26:2245-2256(2008); Dvir-Ginzberg et al., FASEB J, 22:1440-1449(2008); Turner et al., J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 82B:156-168(2007); 和 Miyazawa et al., Journal of Gastroenterology and Hepatology, 22:1959-1964(2007)。

[0145] 还可在“3D”(聚集的)培养物中培养细胞。一个实例是 2009 年 1 月 21 日提交的 PCT/US2009/31528。

[0146] 一旦在培养物中被建立,细胞可被新鲜使用,或者使用例如含 40%FCS 和 10%DMSO 的 DMEM 冷冻并以冷冻储液形式储存。对于用于制备所培养的细胞的冷冻储液的其他方法也是本领域技术人员可获得的。

[0147] 药物制剂

[0148] 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,所述细胞群体存在于组合物中,所述组合物被改造为适于递送,也就是生理学相容的。

[0149] 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%。具体地,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达,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。

[0150] 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。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 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%。

[0154] 在某些实施方案中,将细胞封装(胶囊化)给药,特别是当胶囊化可提高治疗效力时或者提供操作和 / 或贮藏寿命上的优点时。细胞可在植入前通过胶囊以及膜进行封装。可以预料的是,可使用可用于细胞胶囊化的多种方法中的任意一种。

[0155] 在微囊化细胞的多个实施方案中可使用多种材料。这些材料包括例如聚合物胶囊、藻酸盐-聚-L-赖氨酸-藻酸盐微胶囊、聚-L-赖氨酸藻酸盐微胶囊、藻酸盐微胶囊、聚丙烯腈 / 聚氯乙烯(PAN/PVC)中空纤维以及聚醚砜(PES)中空纤维。

[0156] 可用于给药细胞的细胞微囊化技术为本领域技术人员已知,并且在例如 Chang, P., et al., 1999; Matthew, H. W., et al., 1991; Yanagi, K., et al., 1989; Cai Z. H., et al., 1988; Chang, T. M., 1992 以及美国专利 No. 5, 639, 275 (其描述了例如用于长期维持稳定表达生物活性分子的细胞的生物相容胶囊)中有描述。胶囊化的其他方法见欧洲专利公开 No. 301, 777 和美国专利 No. 4, 353, 888 ; 4, 744, 933 ; 4, 749, 620 ; 4, 814, 274 ; 5, 084, 350 ; 5, 089, 272 ; 5, 578, 442 ; 5, 639, 275 和 5, 676, 943。所有上述文献都以引用的方式纳入本文中与细胞胶囊化有关内容。

[0157] 某些实施方案将细胞整合至聚合物中,例如生物聚合物或合成聚合物。生物聚合物的实例包括但不限于纤连蛋白、纤维蛋白(fibin)、纤维蛋白原(fibrinogen)、凝血酶、胶原和蛋白聚糖。其他因子例如上面讨论的细胞因子也可被整合至所述聚合物中。在本发明的其他实施方案中,细胞可被整合至三维凝胶的间隙中。大的聚合物或凝胶通常通过手术植入。可配制成足够小的颗粒或纤维的聚合物或凝胶可通过其他常规的、更方便的、非手术的途径给予。

[0158] 所述细胞的剂量可在很大范围内变化,并且在每种具体情况下均会适合个体需求。一般地,在肠胃外给药的情况下,常规地给予约 1 万个至约 2 千万个细胞 /kg 受体体重。细胞的数量将根据以下因素变化:受体的体重和病症、给药的次数或频率以及本领域技术人员已知的其他可变因素。可通过适于所述组织或器官的途径给予所述细胞。例如,它们可被全身给予,即经肠胃外给予、通过静脉给予,或者可以被靶向具体的组织或器官;它们可被通过皮下给药或通过向具体的所需组织中的给药而被给予。

[0159] 所述细胞可以约 0.01×10^6 个至约 5×10^6 个细胞 /ml 的浓度悬浮于合适的赋形剂中。对于注射溶液适合的赋形剂是与细胞和受体在生物学和生理学上相容的那些赋形剂,例如缓冲的盐水溶液或其他合适的赋形剂。用于给药的所述组合物可根据符合适当的无菌性和稳定性的标准方法而配制、产生和存储。

[0160] 对淋巴造血组织给药

[0161] 用于向这些组织中给药的技术是本领域中已知的。例如,骨髓内注射可以包括将细胞直接注射进入骨髓腔中,其通常为髂后嵴的骨髓腔但是还可以包括髂嵴、股骨、胫骨、肱骨或尺骨中的其他位点;脾脏注射可以包括在射线拍照指导下注射进入脾脏,或者通过腹腔镜或剖腹手术暴露脾脏;派伊尔氏淋巴集结(peyer's patch)、GALT 或 BALT 注射可以要求剖腹术或腹腔镜注射过程。

[0162] 确定剂量

[0163] 用于人或其他哺乳动物的剂量可无需过度实验即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。适合用于本发明的各个实施方案的细胞 / 培养基的剂量会依赖于许多因素。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 ; 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 / 培养基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 / 培养基的可及性 (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 / 培养基的方式, 给予所述细胞 / 培养基的方式, 以及所述细胞 / 培养基在给药之后在所述靶位点处集中 (localize) 的程度。

[0164] 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。

[0165] 在多个实施方案中, 可以以初始剂量给予细胞 / 培养基, 之后通过进一步给药来维持。初始可用一种方法给予细胞 / 培养基, 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 / 培养基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 / 培养基和 / 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。

[0166] 细胞 / 培养基可以多种频率在很宽时间范围内给予。一般地, 治疗的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。

[0167] 用途

[0168] 给予所述细胞可用于在任意数目病理状况中提供血管生成, 包括但不限于任意的缺血症状例如急性心肌梗塞、慢性心力衰竭、外周血管疾病、中风、慢性完全闭塞、肾脏缺血和急性肾损伤。

[0169] 一种或多种促血管生成因子的诱导物可以在给药前和所述细胞混合来给予或者和所述细胞共给予 (同时或依次地)。

[0170] 此外, 由本申请描述的生物学机制知识提供了其他用途。这些用途中的一种包括药物发现。该方面包括就调节表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的能力和 / 或所述细胞分泌的一种或多种促血管生成因子的血管生成效果筛选一种或多种化合物。这涉及测定所述细胞表达和 / 或分泌一种或多种促血管生成因子的能力和 / 或所述一种或多种促血管生成因子的血管生成效果。因此, 该测定可以设计为在体内或在体外进行。

[0171] 细胞 (或培养基) 可以通过直接测定因子蛋白或 RNA 进行选择。这可以通过任意本领域可得到的已知技术来完成, 例如通过 FACS 和其他基于抗体的检测方法以及 PCR 和其他基于杂交的检测方法。间接测定也可以用于因子表达, 例如结合到任意已知的受体。间接效

应还包括测定由因子结合到其任意受体而触发的任意的具体生物学信号传递步骤 / 事件。因此,还可以使用基于细胞的测定。下游目标也可以用来测定所述一种或多种促血管生成因子的表达 / 分泌。检测可以是直接的例如通过 RNA 或蛋白测定或者间接的例如这些因子的一种或多种生物学效应的生物学测定。

[0172] 因此,可以使用替代的标志物,只要其可以作为细胞表达 / 分泌一种或多种促血管生成因子的指示剂。

[0173] 用于表达 / 分泌的测定包括但不限于对组织样本或细胞的 ELISA、Luminex、qRT-PCR、因子抗体蛋白质印迹(anti-factor western blot)和因子免疫组织化学。

[0174] 对细胞和条件培养基中的因子的定量确定可以使用市售测定试剂盒(例如,依赖两步骤消减的基于抗体的测定(two-step subtractive antibody-based assay)的 R&D 系统)来进行。

[0175] 体外血管生成测定还可以用于评价所述因子的表达 / 分泌。这种体外血管生成测定在本领域是公知的。参见,例如本申请描述的 HUVEC 管形成测定、内皮细胞增殖或迁移测定、主动脉环测定和鸡胚尿囊膜测定(CAM)。体内血管生成的测定还可以使用任意已知的体内测定血管生成的测定来实现,例如matrigel plug测定、鸡主动脉弓测定和基质胶海绵测定。

[0176] 本发明的进一步用途是建立可提供用于临床给药的细胞的细胞库。通常,这一过程的基本部分是在多种治疗性临床环境中提供用于给药的具有所需效能的细胞。

[0177] 任何用于药物发现的同样的测定也可应用于为所述细胞库选择细胞以及从细胞库选择用于给药的细胞。

[0178] 因此,在建立细胞库过程中,将就所述细胞(或培养基)实现任意上述效果的能力进行测定。然后,会选择具有用于任意上述效果的所需效能的细胞,这些细胞将形成建立细胞库的基础。

[0179] 还考虑到了通过用外源化合物处理来增加效能,所述化合物例如通过用大的组合文库筛选细胞而发现的化合物。这些化合物文库可以是试剂文库,所述试剂包括但不限于小的有机分子、反义核酸、siRNA DNA 适体、肽、抗体、非抗体蛋白质、细胞因子、趋化因子和趋化物。例如,细胞可在培养和制备过程中的任意时间暴露于这类试剂。唯一的要求是有足够数目使得所需测定得以进行以评估所述试剂是否增加效能。在上文描述的一般药物发现方法中发现,在入库前的最后传代过程中,可以更有利地应用这类试剂。

[0180] 已经成功应用于 MultiStem 的一个实施方案如下所述。从合格的骨髓供体中分离细胞,所述合格的骨髓供体已经接受了特定的测试要求以确定从该供体得到的细胞产物可安全地在临床情况下使用。使用手工或自动化方法分离所述单核细胞。将这些单核细胞置于培养中,使得这些细胞贴壁至经处理的细胞培养容器表面。可使 MAPC 细胞在经处理的表面扩增,在第 2 天和第 4 天更换培养基。在第 6 天,通过机械方法或酶学方法将细胞从所述经处理的基质中移走,并且重置于另一个经处理的细胞培养容器的表面。在第 8 天和第 10 天,如前所述将所述细胞从所述经处理的表面移走并且进行重放置。在第 13 天,将所述细胞从所述经处理的表面移走,洗涤并且与冷冻保护材料结合,并且最后在液氮中冷冻。在所述细胞已经冷冻至少 1 周之后,取出细胞的等分试样并用于效能、同一性、无菌性测试以及其他测试以确定所述细胞库的可用性。然后,可通过解冻该库中的这些细胞,将它们置于培

养中来使用这些细胞,或者在解冻之后使用它们来治疗可能的适应症。

[0181] 另一个用途是对给予所述细胞之后的效能和有益的临床效果进行诊断测定。根据所述适应症,可以有可用于评估的生物标志物。细胞的剂量可在治疗期间根据所述效果进行调整。

[0182] 另一个用途是评估所述细胞达到上述任意结果的功效,所述评估作为将所述细胞给予受试者之前的治疗前诊断。另外,剂量可以依赖正在给予的细胞的效能而定。因此,针对效能的治疗前诊断测定可用于确定初始给予所述患者的细胞剂量,并可能用于在治疗期间基于临床效果的实时评估来确定进一步给予的细胞剂量。

[0183] 还应该理解的是,本发明所述的细胞不仅可以为治疗目的提供血管生成,也可以为研究目的在体内和体外提供血管生成以便理解正常和疾病模型中血管生成涉及的机制。在一个实施方案中,体内或体外的血管生成测定可以在已知的参与血管生成的试剂存在的情况下进行。然后可以评估这些试剂的效果。这些类型的测定还可以用于筛选对血管生成有效应的试剂,所述的血管生成可被本发明所述的细胞促进。因此,在一个实施方案中,可以在疾病模型中筛选逆转消极效果和 / 或促进积极效果的试剂。相反地,可以在正常血管生成的模型中筛选具有消极效果的试剂。

[0184] 组合物

[0185] 本发明还涉及细胞群,其具有实现本文描述的任意效果的具体效能。如上所述,这些群是通过选择具有所需效能的细胞建立的。这些群被用于制备其他组合物,例如包含具有具体所需效能的群的细胞库和包含具有具体所需效能的细胞群的药物组合物。

[0186] 在一个实施方案中, $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ 的结合物可以增强所述细胞的血管生成效能。将所述细胞暴露于这种因子结合物可增加促血管生成基因表达,例如 CXCL5、FGF2 和 HGF。在这些条件下 IL-8 也可能增加。

[0187] 促血管生成分子的分泌还可以通过将细胞用前列腺素 F 类似物拉坦前列腺素处理而增加。通过 RT-PCR 分析的促血管生成因子的基因表达显示了 HGF、VEGF、KITLG 和 IL-8 的增加。生物前列腺素 F 还增加了 VEGF A 水平。

[0188] 实施例

[0189] 实施例 1

[0190] 目标

[0191] 已经显示在缺血损伤后递送外源干细胞可以通过给予损伤组织营养支持来提供治疗性益处,其中的营养支持是通过调节免疫和炎症细胞、限制细胞凋亡、刺激新血管生成以及招募宿主组织用于修复。之前的结果表明, MultiStem 对缺血损伤有益的机制可能部分地是 MultiStem 通过促进血管生成诱导新血管形成的能力的结果。因此,本研究旨在检验 MultiStem 是否能诱导血管生成并鉴定负责该活性的因子以及比较 MultiStem 和 MSC 的血管生成活性。

[0192] 方法和结果

[0193] 使用已得到确认的体外人脐静脉内皮细胞(HUVEC)血管生成测定,发明人发现 4 天后从 MultiStem 收集的条件培养基在体外诱导了血管生成。发明人鉴定了由 MultiStem 分泌的多种促血管生成因子,包括 VEGF、CXCL5 和 IL-8,并且发现这全部三种因子对于 MultiStem 诱导血管生成都是必需的。有趣的是,没有发现培养的骨髓衍生的间充质干细胞

(MSC) 表达 CXCL5 和 IL-8。与 MultiStem 不同,在这个体外系统中仅来自 MSC 的条件培养基不能诱导血管生成。

[0194] 结论

[0195] MultiStem 可以诱导血管生成,部分地通过 IL-8、VEGF 和 CXCL5 的表达。这种分泌谱与 MSC 不同并且这些不同反映在它们的功能性活性上。

[0196] 精简摘要

[0197] 使用已得到确认的血管生成测定,发明人发现从 MultiStem 收集的条件培养基在体外诱导了血管生成。发明人鉴定了由 MultiStem 分泌的多种促血管生成因子,包括 VEGF、CXCL5 和 IL-8,并且发现这全部三种因子对于 MultiStem 诱导血管生成都是必需的。有趣的是,没有发现培养的骨髓衍生的间充质干细胞(MSC)表达 CXCL5 和 IL-8。与 MultiStem 不同,在这个体外系统中来自 MSC 的条件培养基不能诱导血管生成。

[0198] 缺血损伤,以流到组织或器官的血液减少为特征,由于到达缺血区域的营养和氧减少导致的组织损伤和细胞死亡,可以具有毁灭性的后果¹。急性心肌梗塞(AMI)、外周血管疾病(PVD)和中风是由分别流向心脏、四肢和脑的血液减少引起的缺血损伤的三个常见例子。这些病症可以导致严重的长期器官损害、四肢截肢甚至由于氧和营养丧失的死亡。这些病症的治疗常常集中于快速恢复到损伤区域的血流以阻止进一步的组织损害、细胞死亡并减少炎症²。

[0199] MultiStem[®],从骨髓衍生的大规模扩增的贴壁多能祖细胞群,在动物模型中当被递送至下述的缺血损伤例如 AMI 和 PVD 时已经被证实是有益的³⁻⁶。例如,与赋形剂对照相比,在由直接左前降支动脉结扎诱发的心肌梗死后,将 MultiStem 递送至梗死周围位点导致了左心室收缩性能改善、创伤区域减少、血管密度增加和心肌能量特征改善⁷。在严重下肢缺血模型中,小鼠和人 MultiStem 也已被证实可改善肢体活动、增加血流量和毛细血管密度并减少坏死⁵。由于 MultiStem 植入的低水平和 MultiStem 到心肌或内皮细胞的极小量分化,MultiStem 对于 AMI 和 PVD 的益处被认为来源于旁分泌效应。

[0200] 与赋形剂治疗的对照相比,在 MultiStem 治疗的 AMI 和 PVD 动物中观察到的血管密度增加表明,MultiStem 可能能够通过促进血管生成而诱导新血管形成。这种活性可能是对 AMI 和 PVD 的治疗有益的重要机制。血管密度增加最终导致了血流量增加,因此到损伤位点的氧和营养递送增加⁸⁻⁹。

[0201] 大量研究已证实,干细胞可以通过分泌促血管生成因子(例如 VEGF)促进或增强血管生成和新血管形成¹⁰⁻¹¹。基于这些研究,发明人假定,MultiStem 也具有诱导血管生成的能力。因此,MultiStem 被检查来确定它是否分泌可促进血管生成的因子。使用血管生成因子免疫印迹阵列,检测了来自从常见供体建立的 MultiStem 和 MSC 培养物的条件培养基,证明了两种培养物环境中具有一致的血管生成因子表达模式。

[0202] 收集自 MultiStem 的无血清条件培养基在体外诱导了血管生成。鉴定了由 MultiStem 分泌的多种促血管生成因子,包括 VEGF、CXCL5 和 IL-8;免疫耗竭研究证明全部三种因子对于 MultiStem 诱导的血管生成都是必需的。但是,这些因子单独均不足以诱导血管生成。

[0203] 培养的骨髓衍生的间充质干细胞(MSC)没有表达 CXCL5 和 IL-8。与 MultiStem 不同,在这个体外系统中来自 MSC 的条件培养基不能诱导血管生成。以前的研究已经证明,在

缺血动物模型中 MSC 可以在体外稳定血管形成并增加血管密度,然而最近的研究已经表明在某些条件下 MSC 阻止血管生成并导致内皮细胞死亡¹¹⁻¹³。这些结果表明,在没有与内皮细胞共培养的情况下 MSC 不会分泌足够的可溶因子来维持血管生成。综上所述,这些结果表明在多种条件和环境下 MultiStem 和 MSC 具有不同的分泌谱,这些不同反映在它们的旁分泌活动中。

[0204] 材料和方法

[0205] 细胞培养物

[0206] 将人 MultiStem 维持在如前所述的培养物中⁷。MSC 是从 Lonza(Walkersville, MD) 购买并按供应商说明书在培养物中扩大培养。对于同一供体 MultiStem 和 MSC 的制备,对每个细胞系使用前述的条件从新鲜骨髓分离贴壁细胞并培养¹⁴。人脐静脉内皮细胞(HUVEC, Lonza)按照制造商说明书以 2500 个细胞/cm²的浓度在培养中扩大培养。HUVEC 在第 3 次和第 5 次传代之间使用,在用于血管生成测定之前,以 3000 个细胞/cm²浓度铺板并维持三天,此时汇合度约为 70-80%。

[0207] 无血清条件培养基(CM)的制备

[0208] MultiStem 铺于含有 MultiStem 培养基的组织培养瓶中。24 小时后,移走含血清的培养基,用 1×PBS 洗涤细胞并加入含有生长因子但不含血清的人 MultiStem 培养基。不改变培养基培养细胞 4 天,在第 4 天,收集无血清的条件培养基,在 4℃ 以 1900rpm 离心(spun down) 5min,分为小份并储存在 -80℃。

[0209] Panomics 阵列

[0210] Panomics(Fremont, CA) 人血管生成抗体阵列是根据制造商的说明书使用 2ml 的 2 倍稀释的第 4 天无血清 MultiStem 条件培养基样品来进行的。

[0211] 血管生成阵列

[0212] 血管生成抗体阵列(R&D systems, Minneapolis, MN) 是根据制造商的说明书使用 2ml 的 2 倍稀释的来自衍生自同一供体的 MultiStem 和 MSC 的第 3 天条件培养基样品来进行的。

[0213] ELISA

[0214] IL-8、VEGF 和 CXCL5 的蛋白水平是通过 ELISA(R&D Systems) 测定的。对 VEGF 的所有亚型都进行了检测。误差线表示 +/- 标准差。

[0215] VEGF 和 CXCL8/IL-8 免疫耗竭

[0216] 蛋白 A- 琼脂糖珠(Santa Cruz, Santa Cruz, CA) 以 75L 的 50% 匀浆每 1ml CM 的浓度使用。小鼠抗人 VEGF 的单克隆抗体(Santa Cruz) 以 4ug/ml CM 的浓度使用,兔抗人 IL-8 的多克隆抗体(Millipore, Billerica, MA) 以 2ug/ml CM 的浓度使用。正常小鼠 IgG(Santa Cruz) 和色谱纯(ChromPure) 兔 IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 作为同种型对照使用。

[0217] 蛋白 A- 琼脂糖珠与抗 VEGF 的抗体、抗 IL-8 的抗体或同种型对照在 4℃ 下摇晃预孵育过夜,然后用冰冷的 1×PBS 洗涤 4 次,在 4℃ 下以 2500rpm 离心 2 分钟。CM 在 6ml 小份中在 4℃ 下摇晃 2 小时进行免疫耗竭,然后通过 0.45M 滤器过滤以去掉任何残留的珠子。用小鼠 IgG-AC 处理的 CM 作为同种型对照。重组人 VEGF121(eBioscience, San Diego, CA) 和 / 或 VEGF165(R&D Systems) 亚型以 50-1000pg/ml 的浓度范围加回到免疫耗竭的 CM 中。

[0218] CXCL5/ENA-78 中和

[0219] 使用人 CXCL5/ENA-78 抗体 (R&D Systems) 以 10 μ g/ml CM 的浓度在 4 $^{\circ}$ C 下将 CXCL5 摇晃中和 2 小时。使用浓度为 10 μ g/ml CM 的正常总山羊 IgG (Jackson ImmunoResearch) 作为同种型对照。另外使用的对照是内皮生长培养基 (EGM, Lonza), 其中掺入浓度为 10 μ g/ml 的人 ENA-78 中和抗体或正常总山羊 IgG。

[0220] 血管生成测定

[0221] 生长因子减少的基质胶 (BD Bioscience, San Jose, CA) 在冰上在 4 $^{\circ}$ C 下解冻过夜, 以 6.0–6.5mg/ml 的浓度使用, 在冰上使用冰冷的 1 $\times$ PBS 稀释。将 400 微升基质胶分布在 24 孔组织培养板的内部孔中, 并在 37 $^{\circ}$ C 下固化 1 小时。基质胶的加入在冰上进行并且板的外部孔用 1ml 的 1 $\times$ PBS 填充。

[0222] HUVEC 按如下方法收获: 将细胞用 1 $\times$ PBS 洗涤然后用 0.25 $\times$ 胰蛋白酶-EDTA 作短暂的冲洗, 然后用 1 $\times$ PBS (有残留血清) 洗涤以淬灭。将细胞重悬在内皮细胞基础培养基 (EBM) 中并计数。将 HUVEC 加入到 CM, 其他实验条件和对照的浓度为 55,000 个细胞/ml/孔。每个样品和对照作三次重复测定。将板在 5%CO₂ 和 37 $^{\circ}$ C 孵育 6 小时或 18 小时以容许管形成。对每个孔分析 4 个视野, 总共 12 个视野。使用 10 $\times$ 物镜拍摄照片。通过计数细胞间形成的管的数量对血管生成评分。结果表示为每个视野形成的管平均数 $\pm$ SEM。

[0223] 结果

[0224] 可以在体外促进血管生成的 MultiStem 分泌因子

[0225] 以前的研究显示, 与用赋形剂治疗的对照相比, 用 MultiStem 治疗缺血损伤导致了在接近损伤区域的血管密度增加, 表明 MultiStem 可诱导新的血管形成和血管生成。为检验 MultiStem 是否分泌促进血管生成的因子, 利用了一种使用来自 MultiStem 的条件培养基的体外血管生成测定。MultiStem 在正常条件下铺板 24 小时。然后, 所述细胞被转移到无血清条件 4 天来产生条件培养基。然后, 在体外管形成测定中检验该培养基的血管生成活性。HUVEC 铺板在减少生长因子的基质胶上, 该基质胶被进一步稀释到一个浓度, 在该浓度下基质胶和无血清基础 MultiStem 培养基或无血清内皮细胞培养基一起都不会产生任何自发的血管生成。将 HUVEC 铺板在条件培养基、基础培养基或内皮生长培养基中 18 个小时。每个条件下血管生成的测量表示为每个视野内形成的管的平均数。在没有任何额外因子时, 基础培养基中单独存在血清可以诱导血管生成。因此, 所有实验都使用了无血清培养基。在含血清的内皮细胞培养基中观察到了强的、复杂的管形成, 而无血清内皮细胞培养基或无血清基础 MultiStem 培养基显示几乎没有管形成的诱导。发明人发现, 与基础培养基相比, 来自 4 天 MultiStem 培养物的无血清条件培养基诱导了血管生成 (图 1A, B)。

[0226] 为鉴定由 MultiStem 分泌的可以促进血管生成和新血管形成的因子, 在血管生成抗体阵列上分析了 MultiStem 无血清条件培养基 (图 1C)。许多促血管生成因子以及一些抑制血管生成因子由 MultiStem 分泌到培养基中。最显著地是, VEGF 和白细胞介素 8 (IL-8) 是由 MultiStem 分泌的, 两者都是有效的血管生成分子¹⁵⁻¹⁷。CXCL5, 另一种有效的血管生成细胞因子, 也是由 MultiStem 分泌的 (图 1D)¹⁸。VEGF、CXCL5 和 IL-8 在 4 天的 MultiStem 条件培养基中是以生理有效水平表达的 (图 D-F)。

[0227] VEGF 在血管生成诱导中作为关键因子参与的作用促使我们检查 VEGF 对于 MultiStem 的促血管生成活性是否是必需的¹⁹⁻²⁰。使用 VEGF 抗体, 将 VEGF 从 MultiStem 条

件培养基中免疫耗竭。为确保将 VEGF 从培养基中真正地免疫耗竭,使用 VEGF ELISA 测定了免疫耗竭的培养基中的 VEGF 水平。与所述条件培养基和单独清除 IgG 的培养基相比,免疫耗竭的培养基中 VEGF 水平减少了超过 95%(图 2A)。CXCL5 水平和 IL-8 水平没有受 VEGF 免疫耗竭影响(图 2B、C)。在没有 VEGF 时,由 MultiStem 条件培养基诱导的血管生成减少了(图 2,补充图 1)。这些结果证明 VEGF 在 MultiStem 条件培养基中对于诱导血管生成是必需的。

[0228] 为确立在 MultiStem 条件培养基中维持血管生成活性需要的 VEGF 的最低水平,逐渐增量的 VEGF 被加回到免疫耗竭的培养基中。VEGF-A,研究最多的 VEGF 形式,通常称为 VEGF,其有多种亚型包括 VEGF 121 和 VEGF 165。当这两种亚型被分别加回到免疫耗竭的 MultiStem 条件培养基中以测定诱导血管生成需要的 VEGF 的最小量时(图 2A、C),发明人发现虽然两种亚型单独地都不足以完全恢复之前用 MultiStem 条件培养基观察到的血管生成水平,但是 250pg/ml 的 VEGF 121 足够恢复一些血管生成(图 2C)。50pg/ml 的 VEGF 165 足以恢复一定水平的血管生成,并且加入更多 VEGF 165 不会明显看出增加血管生成水平(图 2D)。

[0229] CXCL5 和 IL-8 对于 MultiStem 诱导血管生成的正常水平都是必需的,但不足以诱导血管生成

[0230] 虽然 VEGF 是血管生成需要的,但是 VEGF 单独地以在所述条件培养基中的浓度是不足以诱导强壮的血管生成的²²⁻²⁴。对由 MultiStem 分泌的额外的血管生成因子的鉴定促使我们检查 CXCL5 和 IL-8 对于 MultiStem 的血管生成活性是否是必需的。为检验这个假设,IL-8 被从 MultiStem 条件培养基中免疫耗竭,并且被发现减少达 95% (图 3)。通过 ELISA 测量的 VEGF 和 CXCL5 水平在 IL-8 免疫耗竭的培养基中保持不受影响。在没有 IL-8 时,使用 MultiStem 条件培养基的 HUVEC 体外管形成减少了约 60% (图 3,补充图 II)。这些结果表明,IL-8 对于 MultiStem 条件培养基诱导血管生成是必需的,虽然即使在没有 IL-8 时 MultiStem 条件培养基仍然保持一定水平的血管生成活性。类似地,通过在所述培养基中加入 CXCL5 阻断抗体而阻断 CXCL5 活性导致了 HUVEC 血管生成测定中管形成的显著下降(图 4A)。所述培养基中 CXCL5 水平由于阻断抗体而减少,但是 VEGF 和 IL-8 水平保持不变(补充图 III)。有趣的是,在基础培养基中仅加入 CXCL5、仅加入 IL-8 或加入其两者都不足以诱导血管生成,表明这些因子对于 MultiStem 诱导的血管生成是必需的,但不足以诱导血管生成(图 4B、C)。

[0231] 在体外测定中 MSC 表达 VEGF 但不能引起 HUVEC 的血管生成

[0232] 为评估 MultiStem 诱导的血管生成水平是否同其他干细胞系诱导的血管生成水平相类似,收集来自 MSC 的无血清条件培养基并检验其在培养基中诱导血管生成的能力,与 MultiStem 进行比较。在这个测定中 MSC 条件培养基没有诱导血管生成,即使重复了来自多个供体的 MSC 时也是如此(图 6A,补充图 III)。虽然其他报告显示在体外 HUVEC 测定中 MSC 可以诱导血管生成,但是这些测定是在铺板后 4-6 小时分析的,其显示了不完全的血管生成或使用了不同的条件²⁵⁻²⁷。当在 6 小时检查血管生成管形成时,MSC 和 MultiStem 条件培养基都诱导了一些管形成。但是,到 24 小时,使用 MSC 条件培养基的血管生成瓦解了,而使用 MultiStem 条件培养基的血管生成却继续保持(图 5)。

[0233] 检查了 MSC 条件培养基中 VEGF、CXCL5 和 IL-8 的表达,发现 VEGF 以比在 MultiStem

条件培养基中更高的水平表达,而 MSC 条件培养基中的 CXCL5 和 IL-8 没有以可探测到的水平表达。为确认这些结果是 MSC 分泌谱的指示而不是由无血清培养物引起的假象,由 MSC 表达的 VEGF、IL-8 和 CXCL5 的水平在它们正常培养条件下被检测并与在 MultiStem 培养条件下 MultiStem 条件培养基中发现的这些因子的蛋白水平相比较。对于这些细胞系,发明人从同一供体获得 MSC 和 MultiStem 以排除两种细胞系之间任何的遗传差异。即使这些细胞类型是从同一供体获得的, CXCL5 和 IL-8 水平在 MSC 条件培养基中是不能检测到的,但是在 MultiStem 培养基中以生理有效的水平表达(图 5B)。为进一步检测这些细胞系的分泌谱,发明人在血管生成抗体阵列上(图 6A)对从同一供体获得的细胞的 MultiStem 条件培养基的分泌谱和 MSC 条件培养基的分泌谱进行了比较(图 6, 补充数据 I)。数据显示,有多种由 MultiStem 分泌但 MSC 不分泌的血管生成因子和抑制血管生成因子,包括血管生成素、HGF、IL-8、瘦蛋白、TIMP-4 和 IGFBP-1。相比之下, TIMP-1 (25 倍)和 IGFBP-2 (16 倍)在 MSC 中都以比 MultiStem 更高的水平表达。VEGF 和 IGFBP-3 在 MSC 中也一致地以比 MultiStem 更高的水平表达,虽然只是 3-4 倍。综上所述,这些结果表明,即使来自同一供体的 MultiStem 和 MSC 也有不同的分泌谱并且这些不同反映在细胞系之间功能的不同上。

[0234] 讨论

[0235] 从多种组织(包括骨髓、脐带血和脂肪组织)分离的成体干细胞正在被开发以治疗缺血损伤例如急性心肌梗塞、中风和外周血管疾病²⁸⁻³⁰。这些损伤引起细胞和组织损害,这种损害来自受影响组织初期的氧气和营养丧失,也来自所述区域随后的炎症。快速而持续的血流恢复可以减少缺血区域的损害和炎症。基于细胞的治疗的原本目的是在损伤后通过外源干细胞的递送和随后的分化使损失和损害的组织再生和修复。但是,后续的检查干细胞治疗益处的机制的研究显示,很多干细胞主要通过旁分泌效应起作用而不是通过再生,因为很多细胞类型在递送几天后不再能检测到³¹⁻³³。治疗假设是,这些细胞群可以通过调节免疫和炎症细胞、限制细胞凋亡、刺激新血管生成以及招募宿主组织用于修复来为损伤组织提供营养支持。益处可能来源于这些途径的动态级联,并且不同的细胞群可能在某些途径上更强烈地施加影响。用于治疗的最适当的贴壁干细胞群的选择可以反映给定的细胞群对于关键途径的效能,以及为有效介导所述应答的递送时间。因此,对这些途径建立标准化的测定以提供比较数据然后把这些有活性的体外替代品同损伤和恢复联系起来是重要的。

[0236] 多能成体祖细胞是从骨髓培养物中获得的贴壁成体干细胞群。以前的体内研究显示了,在缺血损伤后用 MultiStem 治疗的动物中血管密度的增加^{4,7}。在本研究中,我们已经显示, MultiStem 可分泌可以在体外管形成测定中诱导血管生成的因子。进一步分析显示, MultiStem 可分泌多种促血管生成因子,包括 VEGF、IL-8 和 CXCL5。这些因子中的两种, CXCL5 和 IL-8,经由 MultiStem 的分泌与经由 MSC 的分泌有很大差别, MSC 分泌的 CXCL5 和 IL-8 即使有,也很少。VEGF、CXCL5 和 IL-8 对于 MultiStem 诱导血管生成都是必需的。除去或抑制这些因子中任一个均会大大地降低 MultiStem 条件培养基促进血管生成的能力。VEGF 165 是涉及血管生成的主要亚型。但是,多种 VEGF 亚型可能对 MultiStem 诱导血管生成起作用,因为在 VEGF 免疫耗竭的 MultiStem 条件培养基中独立地使用 VEGF 121 或 VEGF 165 都不能 100% 地恢复管形成。

[0237] 虽然其他小组已经递送了单一促血管生成因子(例如 VEGF)到动物缺血损伤模型中以提供一些有益效果,但是结果对于临床适应症例如 AMI 和 PVD 来说是混乱的^{34,35}。在大

鼠 AMI 模型中,不受控制的血管生成因子表达可以导致严重的副作用例如血管瘤形成、关节炎和视网膜病,以及严重的胸腔积液和心包积液^{34, 36, 37}。对于 PVD,通过基因或蛋白递送单一血管生成因子的临床试验结果是令人失望的,这很可能是由于多种因素,其包括目前检测的长期益处需要的因子不稳定、递送并发症、缺血组织的低的摄取和应答以及为实现功能性血管形成需要几种共同作用因子。相反,用干细胞对缺血损伤进行治疗可以提供对单一蛋白或基因治疗的有吸引力的替代方案。干细胞治疗缺血损伤的使用可以通过应答并定位到低氧和炎症微环境的细胞导致多种血管生成因子直接递送到损伤位点,实现刺激适当的血管生成应答的动态平衡。此外,干细胞例如 MultiStem 还可以通过免疫调节和抗细胞凋亡机制同时阻止组织损害。在本研究中,发明人证明了 MultiStem 通过至少三种促血管生成因子的表达确实能够直接诱导血管生成。

[0238] 虽然 MSC 表达并分泌高水平的 VEGF,但是在该体外测定系统中来自 MSC 的条件培养基不足以诱导血管生成。以前的研究已经显示 MSC 可以在体外稳定血管形成。但是,这些研究中的很多检查血管形成是在较早的时间点,例如在 4-6 小时或在不同的条件下^{25-27, 38}。发明人发现,在这些较早的时间点,在阴性对照中有高水平的血管生成本底,这种血管生成本底在 24 小时时是不稳定的。类似地,我们发现在 6 小时时, MSC 可以诱导某些水平的血管生成,随后其在 24 小时时间点消失。相反,MultiStem 诱导了在 24 小时保持稳定的管形成。这些结果表明,虽然 MSC 在短期内支持血管生成,但没有其他因子时这种血管形成是不稳定的。这些结果反映了较早研究的数据,其中显示单独的 VEGF 以这些细胞表达的水平不足以引发稳定的血管形成²⁴。在以前用 MSC 治疗缺血损伤显示出血管密度增加的体内实验上下文中, MSC 可以通过诱导内源性炎症细胞或组织祖细胞以促进血管生成来增加血管密度。

[0239] 参考文献

[0240] 1. Rosamond, W. et al., " Heart disease and stroke statistics--2007 update :a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee" *Circulation*, Feb 6 2007 ;115(5) :e69-171.

[0241] 2. Molin, D and Post, M.J., " Therapeutic angiogenesis in the heart :protect and serve" *Current opinion in pharmacology*. Apr 2007 ;7(2) :158-163.

[0242] 3. Kovacsovics-Bankowski, M. et al. " Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease " *Cellular immunology*. 2009 ;255(1-2) :55-60.

[0243] 4. Pelacho, B. et al., " Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction" *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. Jan-Feb 2007 ;1(1) :51-59.

[0244] 5. Aranguren, XLM et al., " Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs by stimulating vessel and muscle regeneration" 2007.

[0245] 6. Kovacsovics-Bankowski, M. et al., " Pre-clinical safety testing supporting clinical use of allogeneic multipotent adult progenitor cells" *Cytotherapy*. 2008 ;10(7) :730-742.

- [0246] 7. Van' t Hof, W. et al., " Direct delivery of syngeneic and allogeneic large-scale expanded multipotent adult progenitor cells improves cardiac function after myocardial infarct" *Cytotherapy*. 2007 ;9(5) :477-487.
- [0247] 8. van der Laan, A. M. et al., " Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI" *Nat Rev Cardiol*. Jun 16 2009.
- [0248] 9. Idris, N. M. et al., " Therapeutic angiogenesis for treatment of peripheral vascular disease" *Growth factors*(Chur, Switzerland). Dec 2004 ;22(4) : 269-279.
- [0249] 10. Markel, T. A. et al., " VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function" *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Dec 2008 ;295(6) :H2308-2314.
- [0250] 11. Payne, T. R. et al., " A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts" *J Am Coll Cardiol*. Oct 23 2007 ;50(17) : 1677-1684.
- [0251] 12. Kinnaird, T., et al. " Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms" *Circulation*. Mar 30 2004 ;109(12) :1543-1549.
- [0252] 13. Tang, Y. L. et al., " Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction" *Ann Thorac Surg*. Jul 2005 ;80(1) :229-236 ; discussion 236-227.
- [0253] 14. Boozer, S. et al., " Global Characterization and Genomic Stability of MultiStem, a Multipotent Adult Progenitor Cell" *Journal of Stem Cells*. 2009 ; 4(1) :17-28.
- [0254] 15. Koch, A. E. et al., " Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint" *Arthritis and rheumatism*. Jan 2001 ;44(1) :31-40.
- [0255] 16. Strieter, R. M. et al., " Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization " *The American journal of pathology*. Dec 1992 ;141(6) : 1279-1284.
- [0256] 17. Keeley, E. C. et al., " Chemokines as mediators of neovascularization" *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nov 2008 ;28(11) :1928-1936.
- [0257] 18. Keane, M. P. et al., " ENA-78 is an important angiogenic factor in idiopathic pulmonary fibrosis" *American journal of respiratory and critical care medicine*. Dec 15 2001 ;164(12) :2239-2242.
- [0258] 19. Carmeliet, P., " Angiogenesis in health and disease " *Nature medicine*. Jun 2003 ;9(6) :653-660.

- [0259] 20. Carmeliet, P., " Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis" Nature medicine. Apr2000 ;6(4) :389-395.
- [0260] 21. Neufeld, G. et al., " Vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptors" Faseb J. Jan1999 ;13(1) :9-22.
- [0261] 22. Kinnunen, K. et al., " Overexpression of VEGF-A induces neovascularization and increased vascular leakage in rabbit eye after intravitreal adenoviral gene transfer" Acta physiologica(Oxford, England). Aug 2006 ;187(4) :447-457.
- [0262] 23. Milkiewicz, M. et al., " Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during non-inflammatory skeletal muscle ischaemia in rat" The Journal of physiology. Dec 12006 ;577(Pt 2) :671-678.
- [0263] 24. Loffredo, F. and Lee, R. T., " Therapeutic vasculogenesis: it takes two" Circulation research. Jul 182008 ;103(2) :128-130.
- [0264] 25. Iwase, T. et al., " Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia" Cardiovasc Res. Jun 1 2005 ;66(3) :543-551.
- [0265] 26. Zacharek, A. et al., " Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke" J Cereb Blood Flow Metab. Oct 2007 ;27(10) :1684-1691.
- [0266] 27. Hung, S. C. et al., " Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis" Stem cells(Dayton, Ohio). Sep 2007 ;25(9) :2363-2370.
- [0267] 28. Burns, T. C. and Verfaillie, C. M., " Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review" The Journal of comparative neurology. Jul 1 2009 ;515(1) :125-144.
- [0268] 29. Singh, S. et al., " Stem cells improve left ventricular function in acute myocardial infarction" Clinical cardiology. Apr 2009 ;32(4) :176-180.
- [0269] 30. Aranguren, X. L. et al., " Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease" Journal of molecular medicine(Berlin, Germany). Jan 2009 ;87(1) :3-16.
- [0270] 31. Zhang, M. et al., " SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction" Faseb J. Oct 2007 ;21(12) :3197-3207.
- [0271] 32. Block, G. J. et al., " Multipotent Stromal Cells(MSCs) are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1(STC-1)" Stem cells(Dayton, Ohio). Dec 18 2008.
- [0272] 33. Gnecci, M. et al., " Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy" Circulation research. Nov 21 2008 ;103(11) :1204-1219.

[0273] 34.Makinen, K. et al., " Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study" Mol Ther. Jul 2002 ;6(1) :127-133.

[0274] 35.Rajagopalan, S. et al., " Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease:a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication" Circulation. Oct 21 2003 ;108(16) :1933-1938.

[0275] 36. Su, H. et al., " Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Jul 9 2002 ;99(14) :9480-9485.

[0276] 37. Schwarz, E. R. et al., " Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor(VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation" J Am Coll Cardiol. Apr 2000 ;35(5) :1323-1330.

[0277] 38. Oswald, J et al., " Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro" Stem cells (Dayton, Ohio). 2004 ;22(3) :377-384.

[0278] 补充数据 I :由 MultiStem 和 MSC 表达的血管生成因子的对比

[0279]

	平均MSC信号: 每ug蛋白中 阳性对照百分数%	平均MultiStem信号: 每ug蛋白中 阳性对照百分数%	St Dev MSC	St Dev MultiStem
血管生成素	0.00000	0.03081	0.00000	0.00400
内皮素-1	0.00317	0.03469	0.00550	0.00524
HGF	0.00000	0.04639	0.00000	0.00737
IGFBP-1	0.00000	0.00148	0.00000	0.00038
IGFBP-2	0.02350	0.00145	0.03394	0.00251
IGFBP-3	0.06941	0.02018	0.01728	0.00374
IL-8	0.00000	0.02004	0.00000	0.00834
瘦蛋白	0.00000	0.01607	0.00000	0.00585
血小板反应蛋白-1	0.00401	0.00334	0.00694	0.00307
VEGF	0.08976	0.03124	0.04583	0.00485

[0280] 实施例 2

[0281] MultiStem 中血管生成因子的表达增强

[0282] 图 7-12 显示可以在 MultiStem(MAPC) 制品中增强血管生成因子的表达。

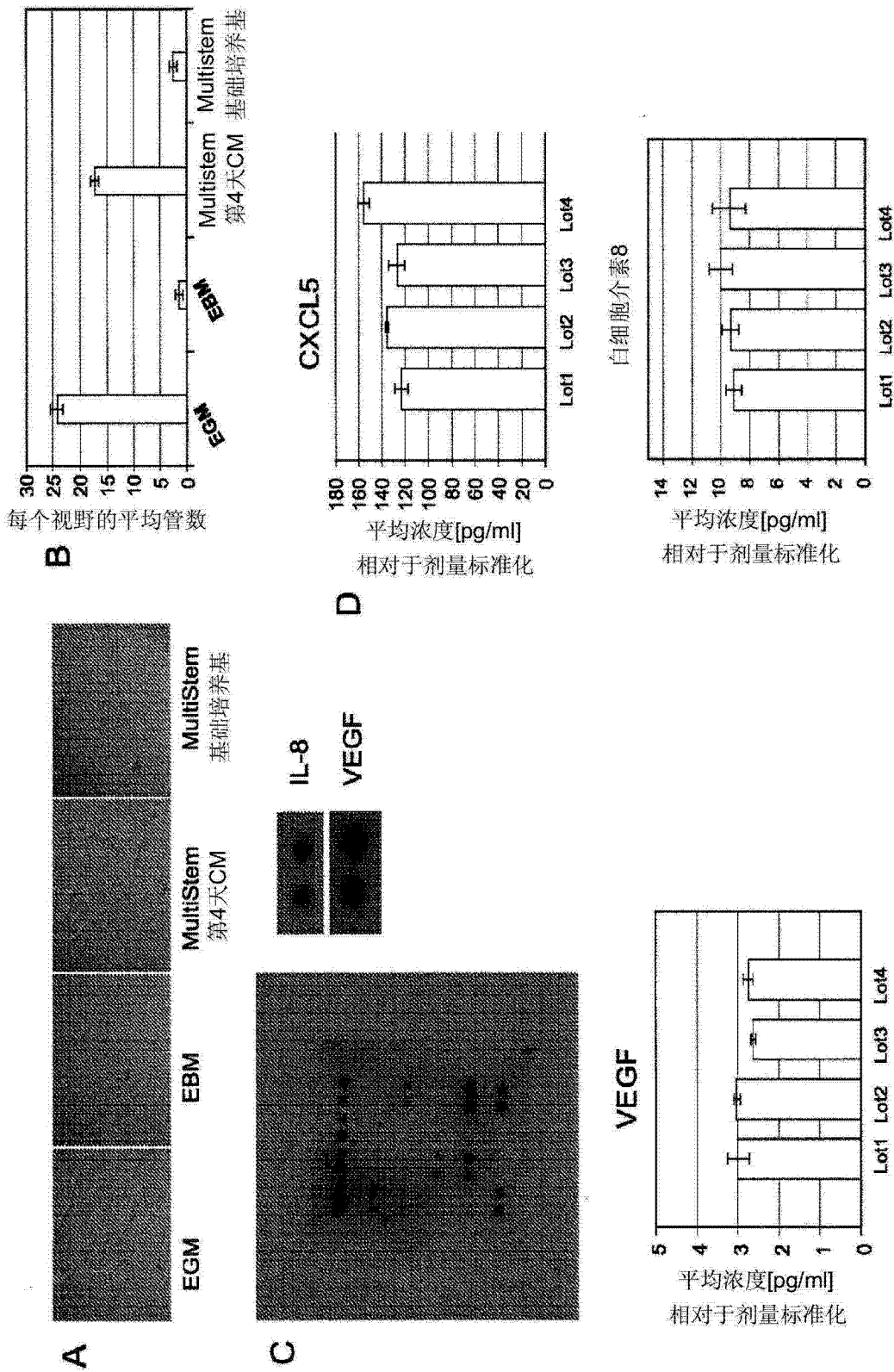


图 1

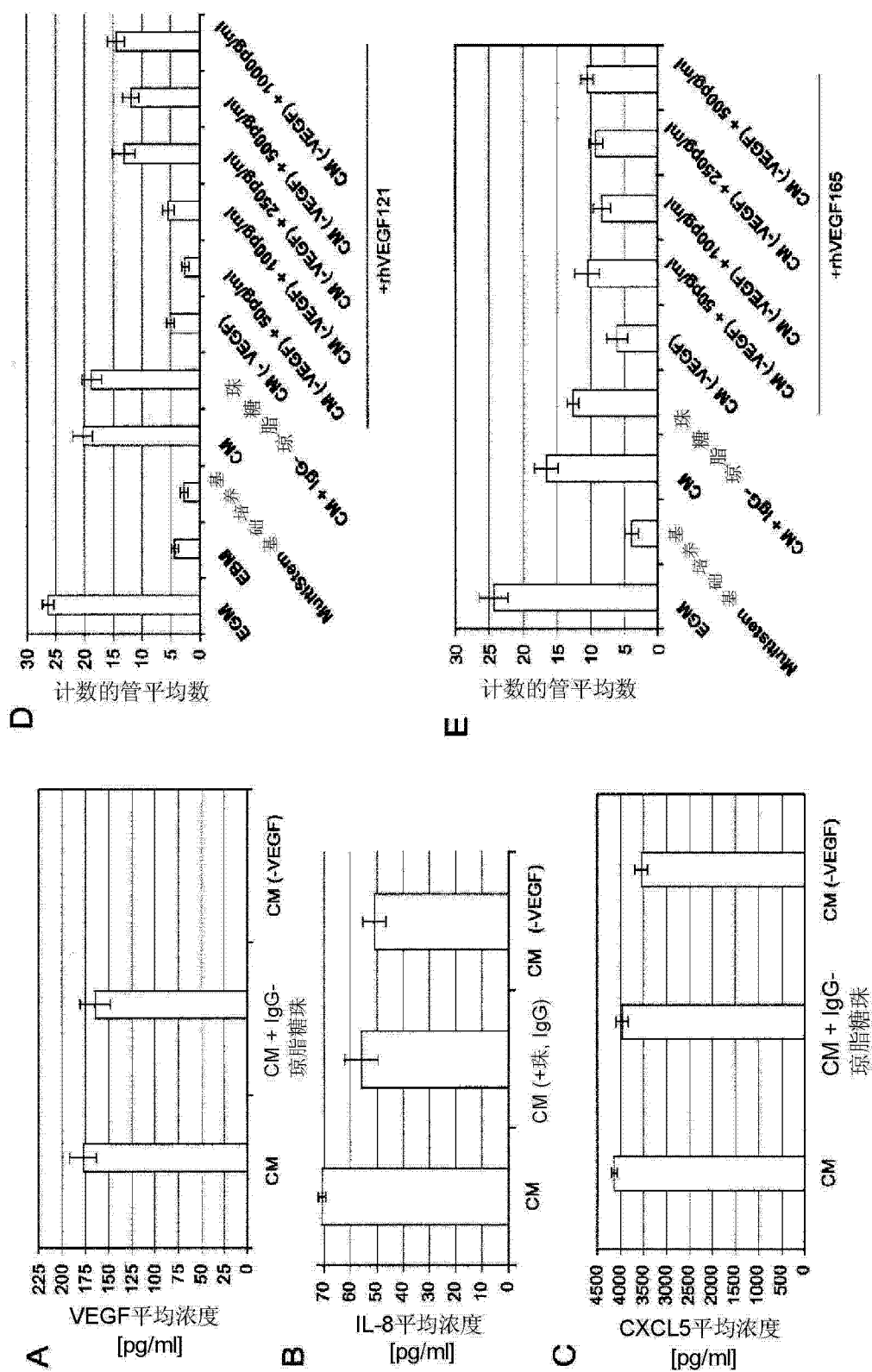


图 2

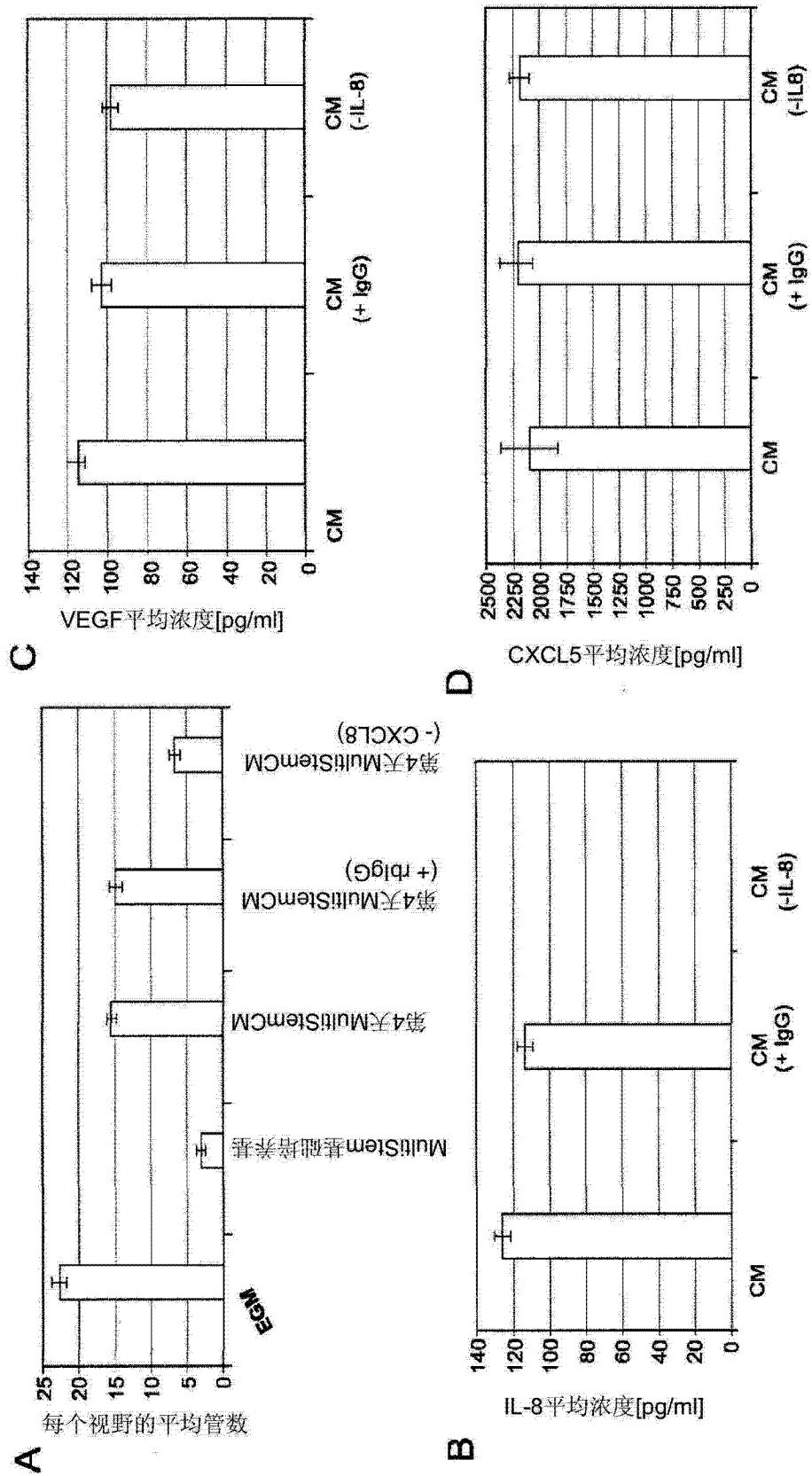


图 3

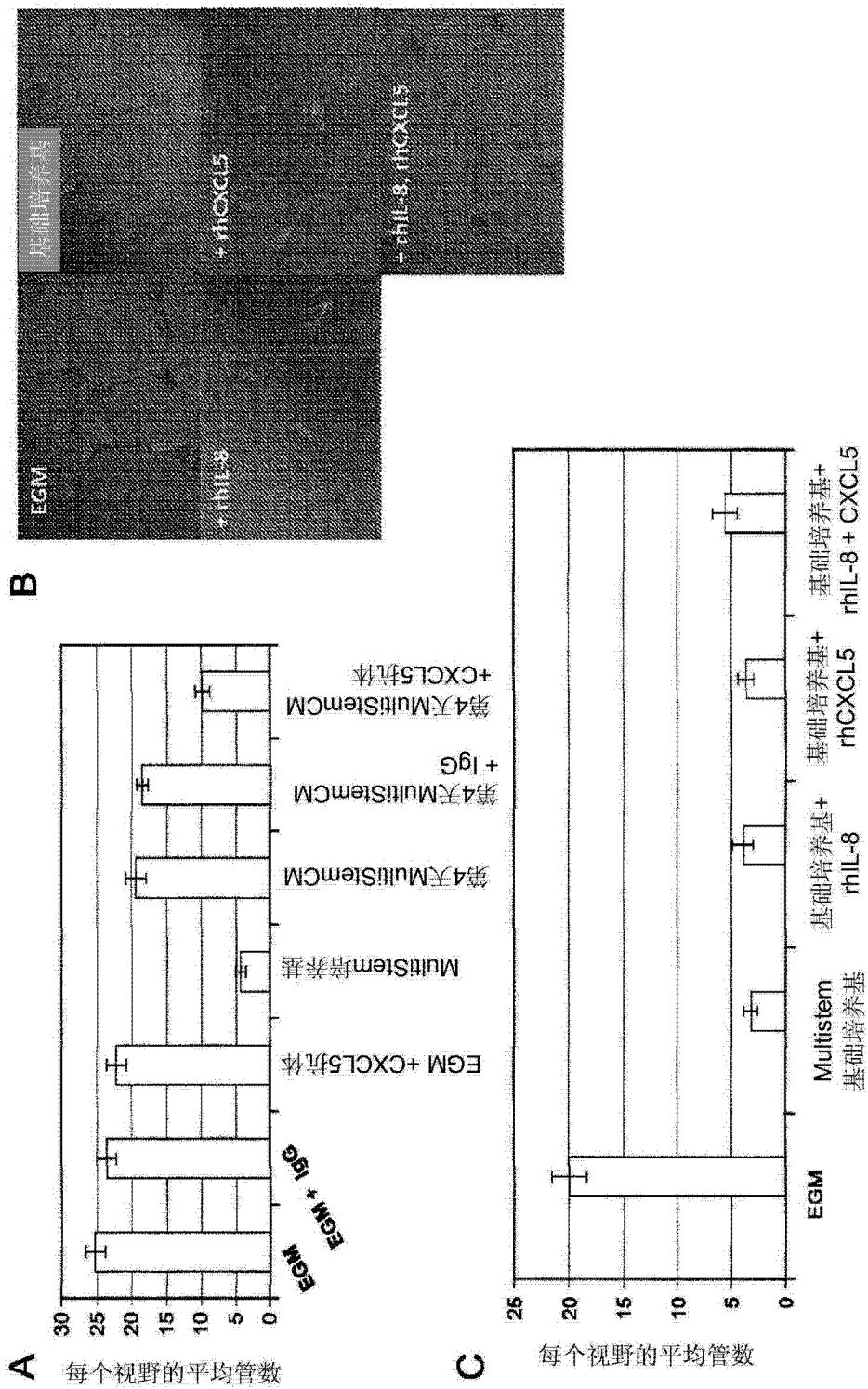


图 4

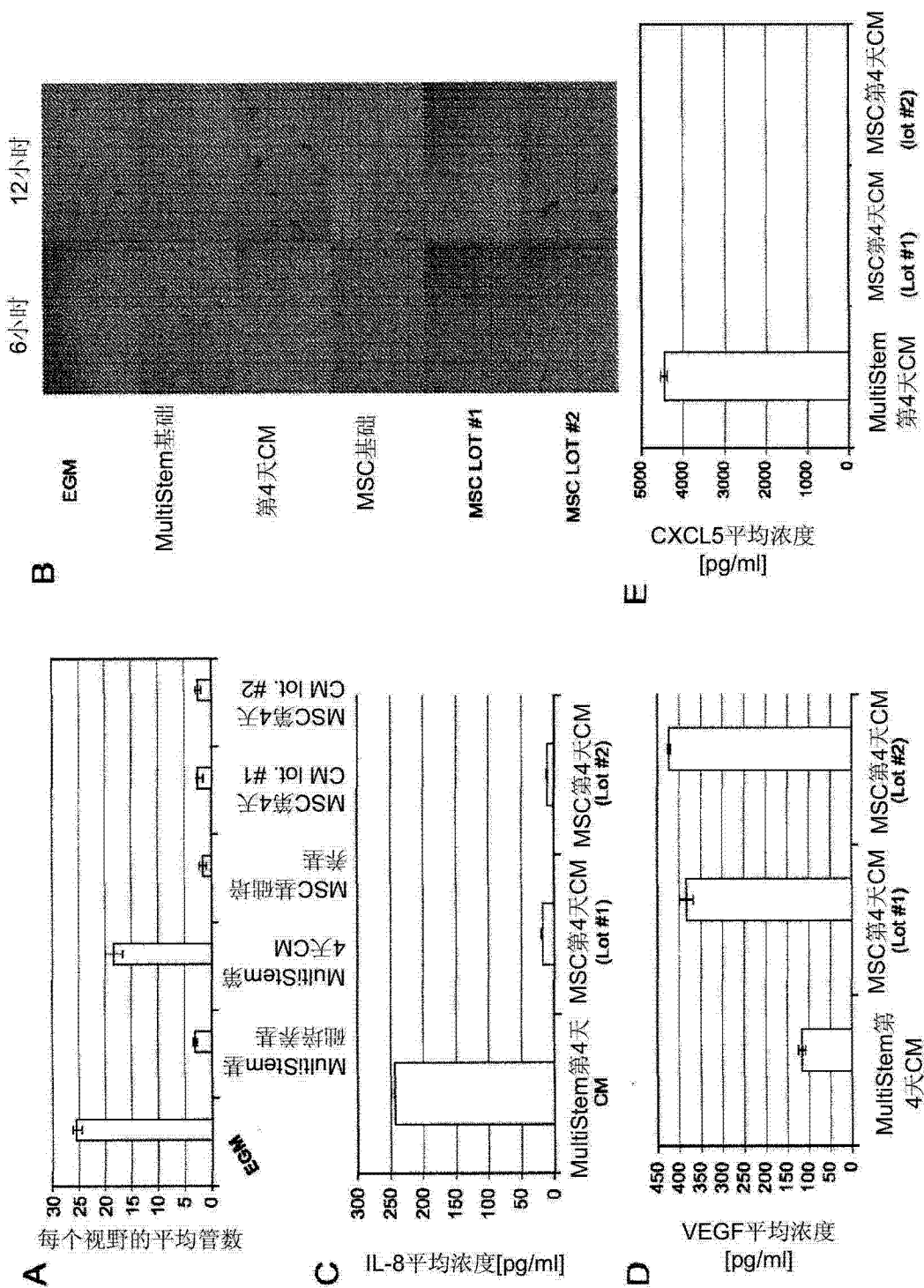


图 5

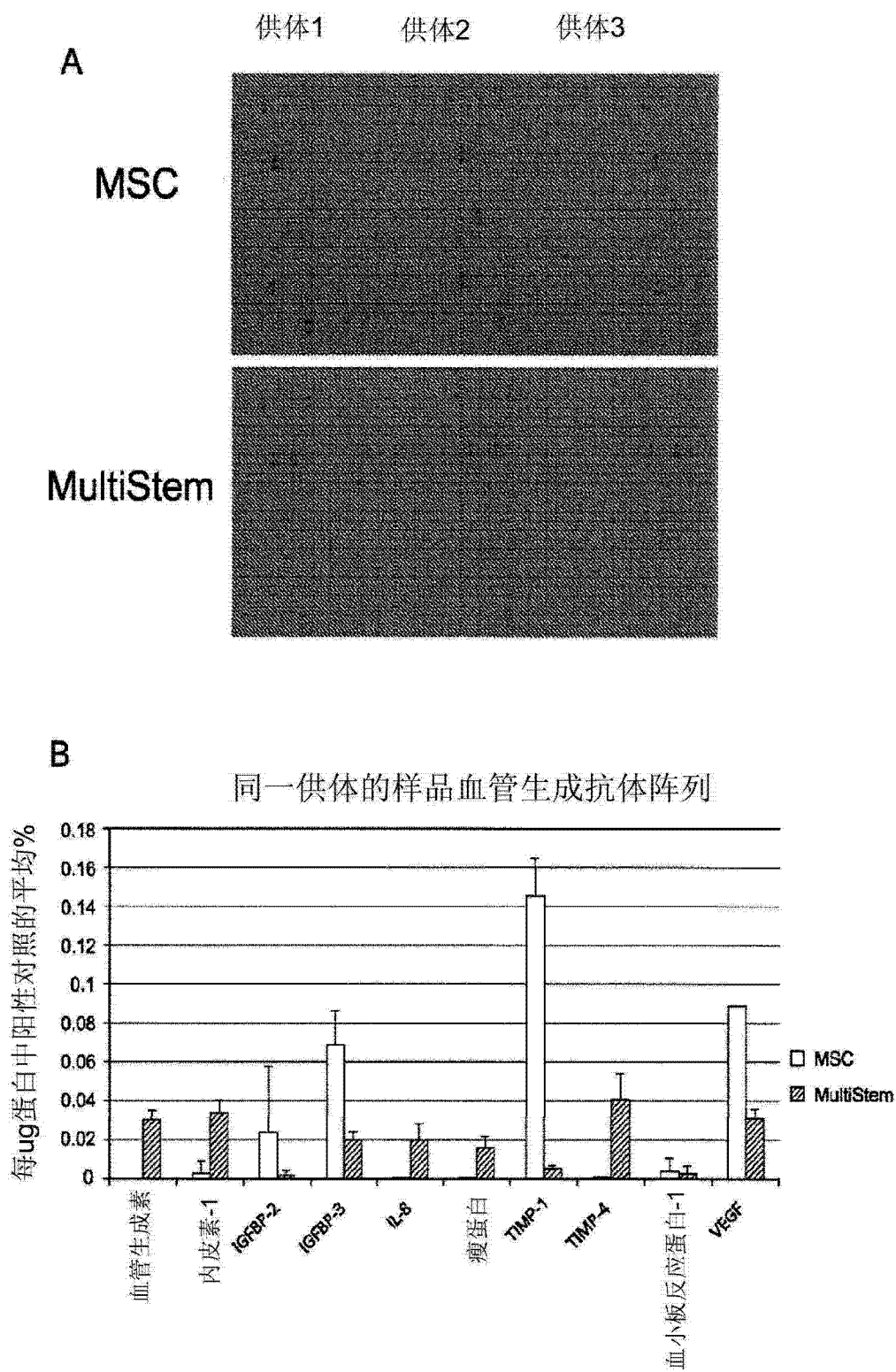


图 6

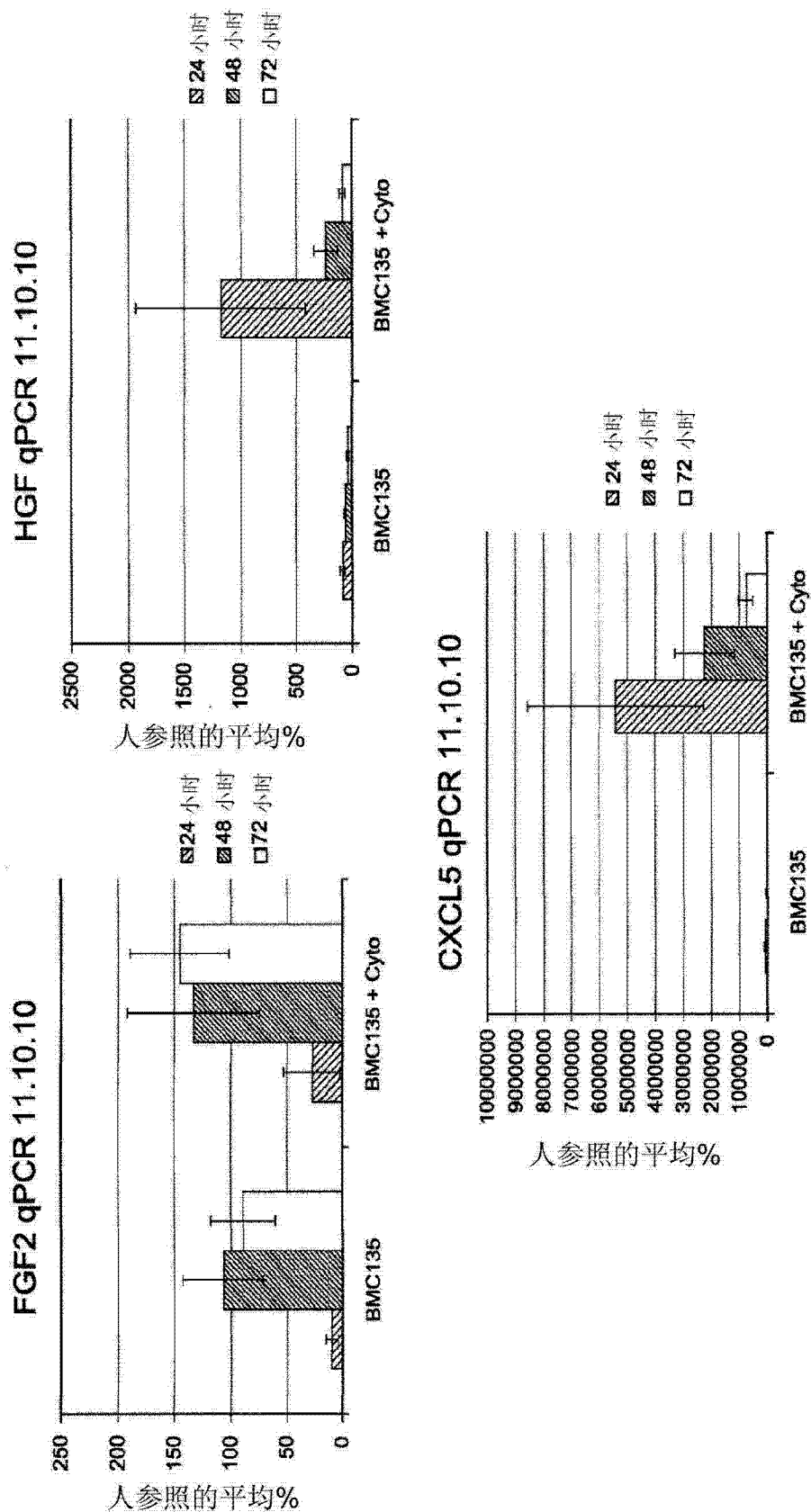


图 7

血管生成因子上调的样品

6 小时				48 小时			
名称	MultiStem 基础表达	MultiStem+ cytomix	倍数变化	MultiStem 基础表达	MultiStem + cytomix	倍数变化	
IL8	7762.2	21887	2.81	184.6	26604.4	144.12	
CXCL5	5176.2	12990.2	2.51	779.6	19267.2	24.71	
VEGFC	3513.2	6143.6	1.75	1101	2777	2.523	
TGFB3	42.5	173.3	4.08	264.1	485.9	1.84	
IL6	312.5	13073.5	41.84	41.4	215.1	5.120	
FGF2	146.2	444.1	3.04	25.7	960.3	37.37	
PTGS2 (cox-2)	458.3	4918.6	10.73	60.9	235.6	3.87	
				1667.5	5296.5	3.18	
				6609.5	10185.1	1.540	
				341.4	894.6	2.62	

图 8

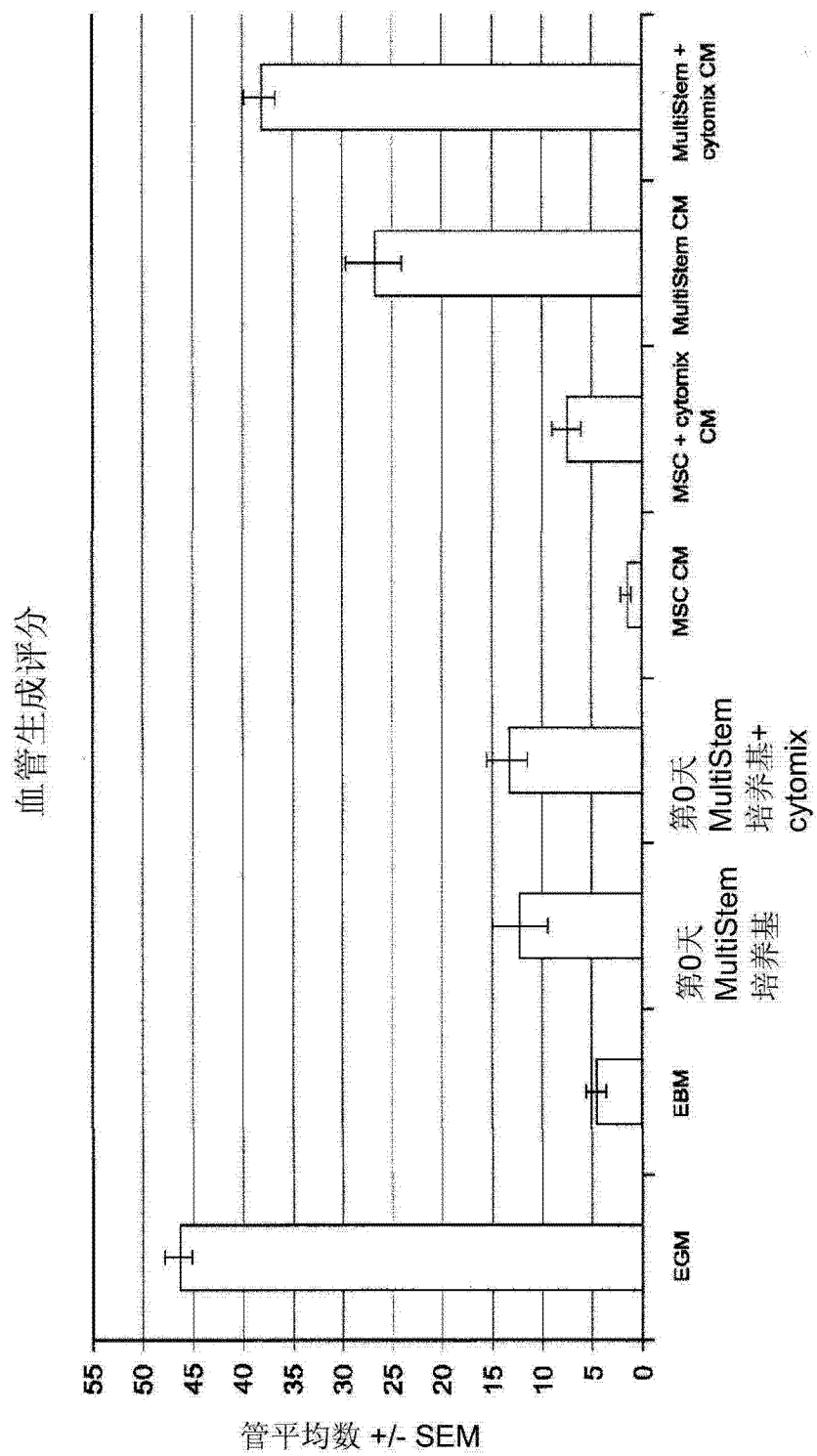


图 9

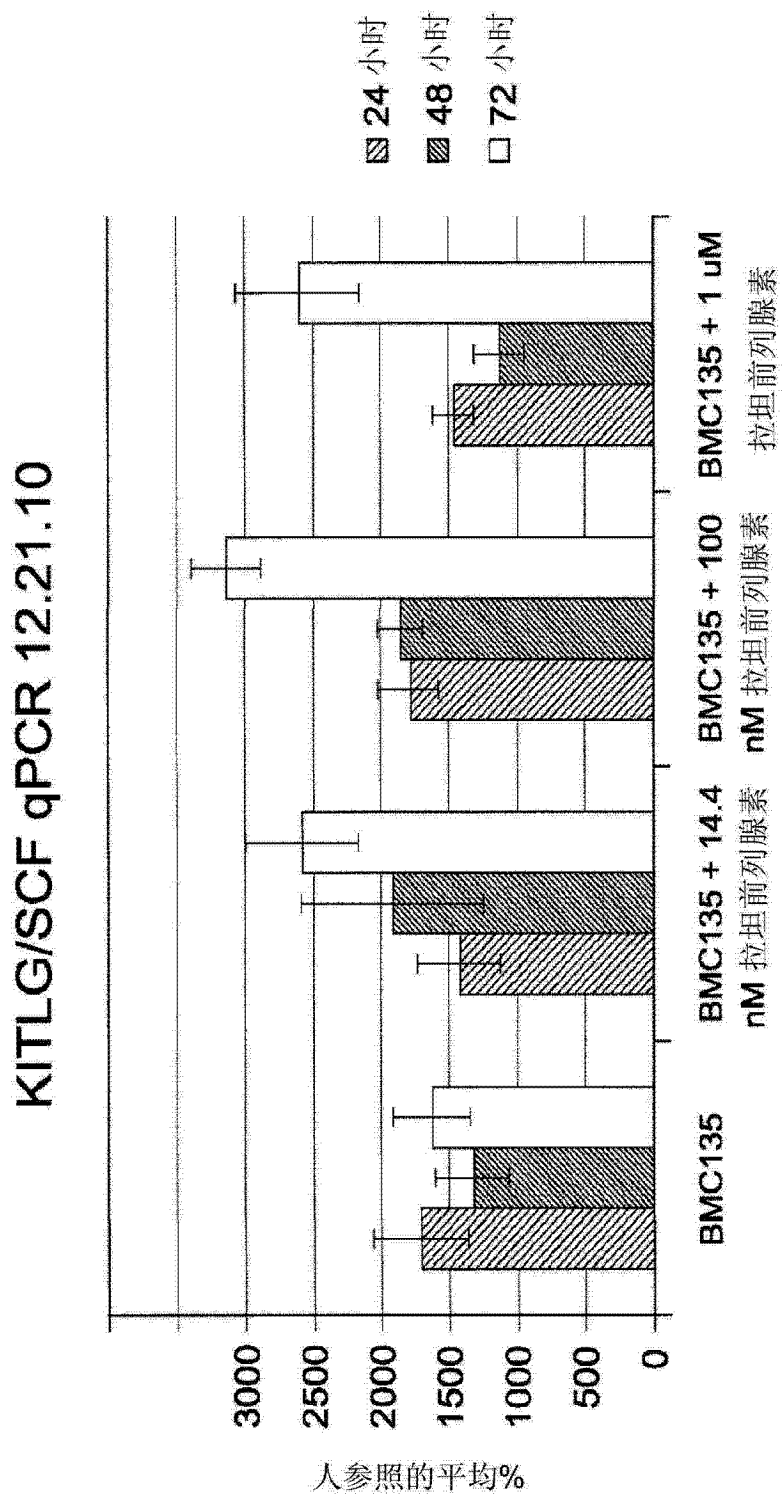


图 10A

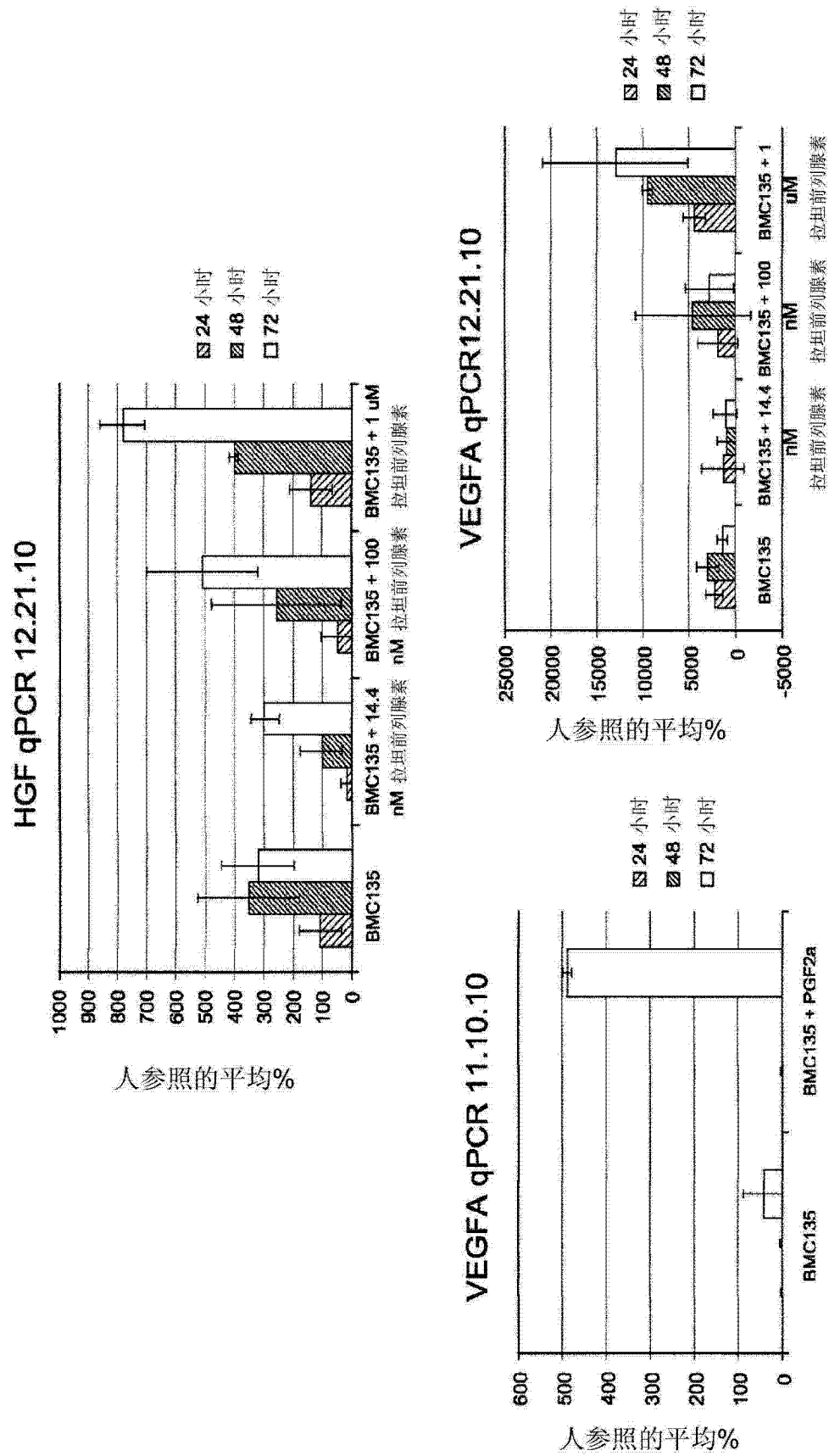


图 10B

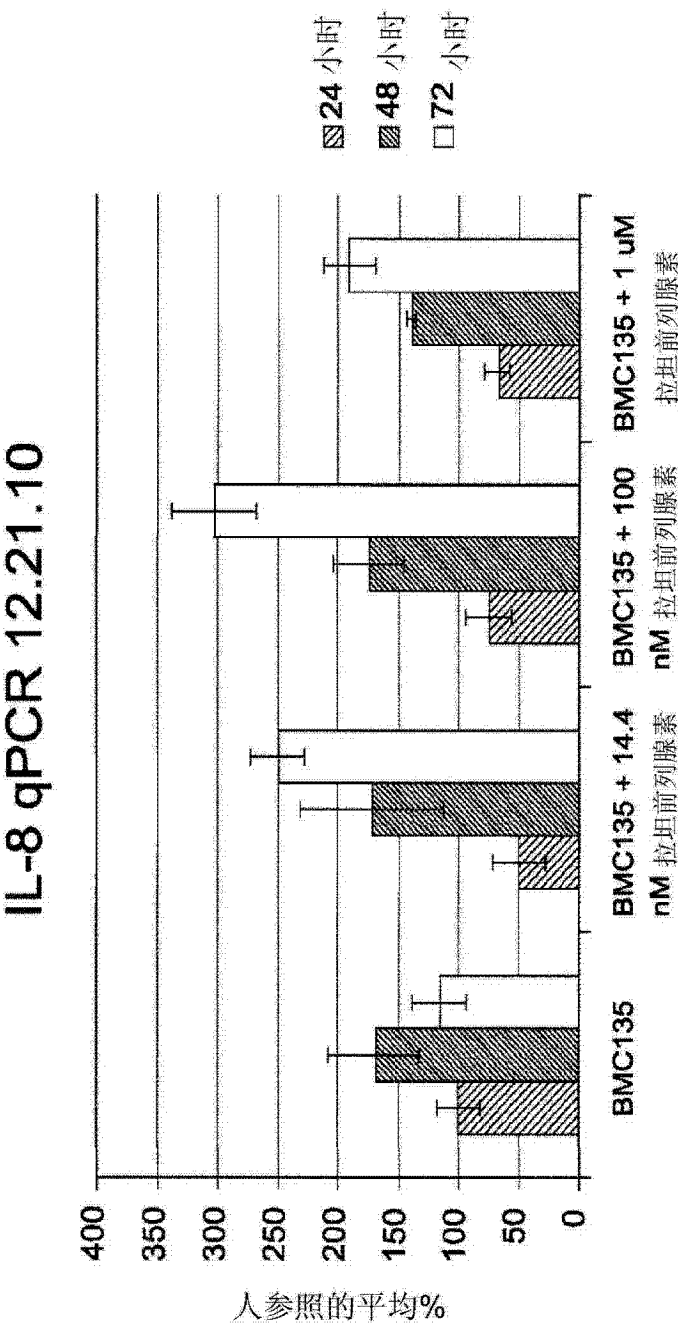


图 10C

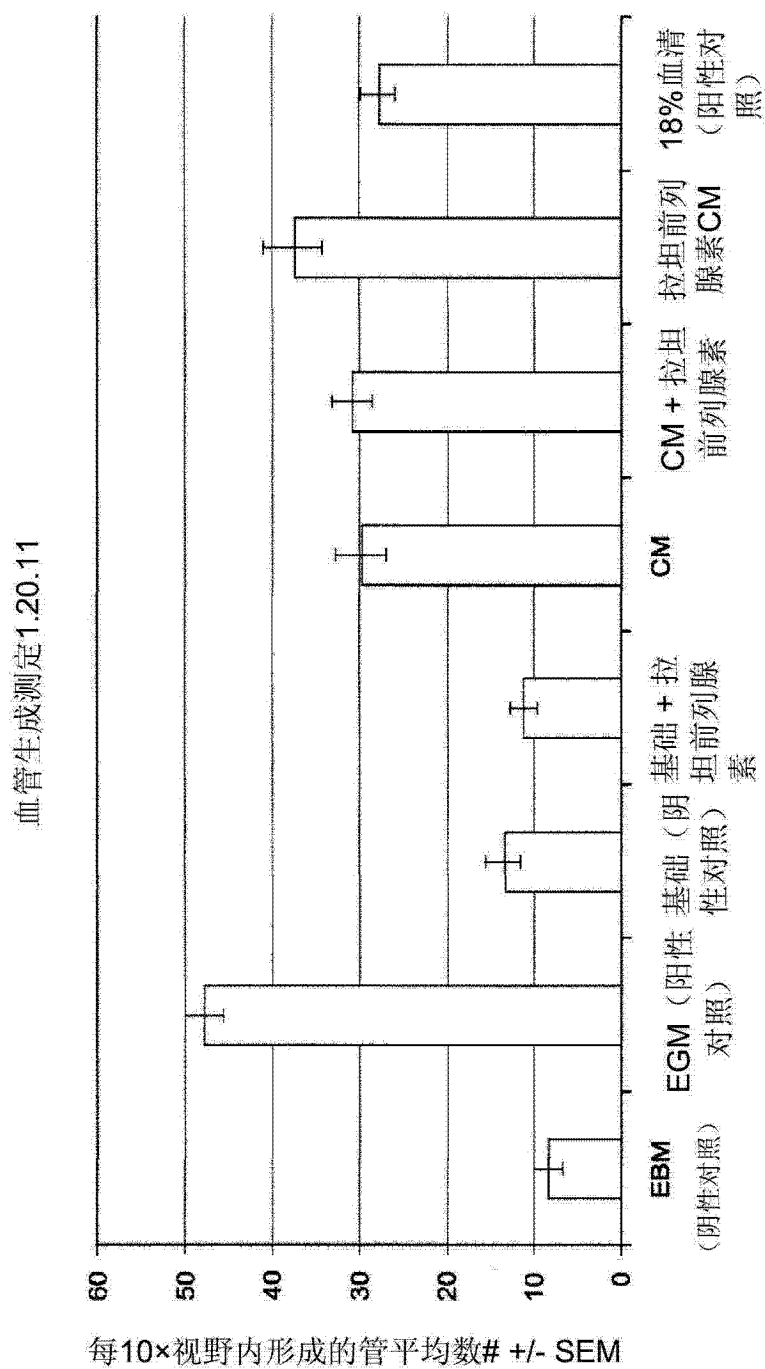


图 11

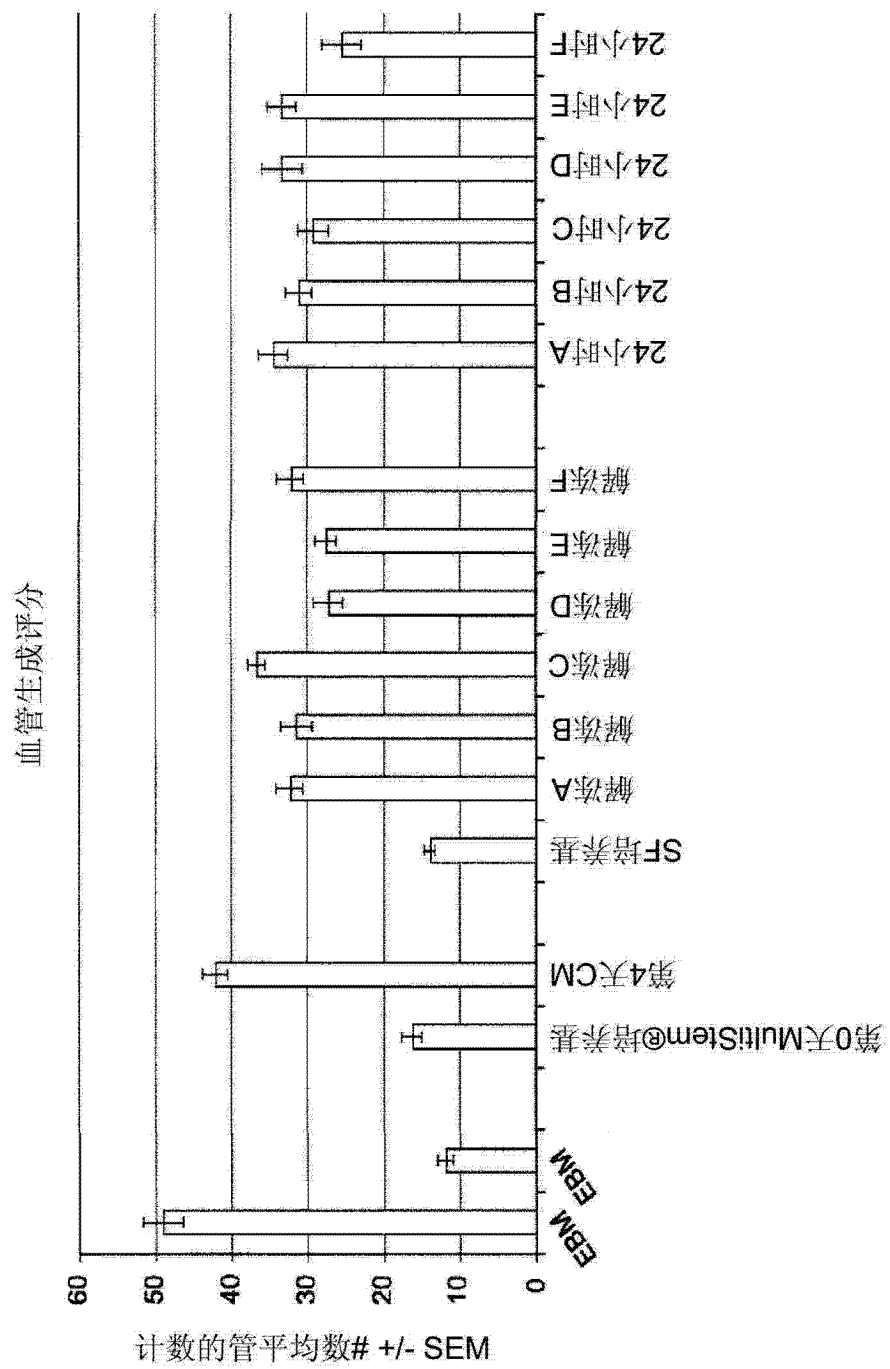


图 12