

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680014301.3

[51] Int. Cl.

A61K 38/19 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 23 日

[11] 公开号 CN 101166541A

[22] 申请日 2006.2.27

[21] 申请号 200680014301.3

[30] 优先权

[32] 2005. 2. 28 [33] US [31] 60/657,287

[86] 国际申请 PCT/US2006/006829 2006.2.27

[87] 国际公布 WO2006/093860 英 2006.9.8

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.26

[71] 申请人 雷格内泰克公司

地址 美国得克萨斯州

[72] 发明人 唐尼·拉德

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘晓东 顾晋伟

权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图 5 页

[54] 发明名称

用于修复心脏组织的方法和组合物

[57] 摘要

本发明涉及哺乳动物血液干细胞优选 CD34 + / CD38 - 细胞的 TVEMF 扩增, 还涉及来源于 TVEMF 扩增细胞的组合物, 还涉及使用所述组合物治疗心脏病或修复心脏组织的方法。

1. 修复心脏组织的方法，其包括对哺乳动物施用治疗有效量的血液干细胞药物组合物的步骤，所述组合物包含扩增的血液干细胞，其在每单位体积中的数目是天然血中的至少 7 倍，并且其中所述血液干细胞具有与天然血中的干细胞基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。
2. 修复心脏组织的方法，其包括对哺乳动物施用治疗有效量的血液干细胞药物组合物的步骤，所述组合物包含 TVEMF 扩增的血液干细胞，其在每单位体积中的数目是天然血中的至少 2 倍，并且其中所述血液干细胞具有与天然血中的干细胞基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。
3. 根据权利要求 2 的方法，其中每单位体积中 TVEMF 扩增的血液干细胞数目是至少 7 倍。
4. 根据权利要求 3 的方法，其中所述施用步骤包括将药物血液干细胞组合物施用到人外周血流、心脏邻近组织或心脏组织中的至少一处。
5. 根据权利要求 3 的方法，其中所述药物血液干细胞组合物还包含人 GM-CSF 和人 G-CSF 中的至少一种。
6. 根据权利要求 3 的方法，其中所述哺乳动物是人。
7. 根据权利要求 3 的方法，其在施用步骤之前，还包括以下步骤：
 - a. 将血混合物置于 TVEMF 生物反应器的培养腔室中；
 - b. 在 TVEMF 生物反应器中，使血液混合物受到 TVEMF 并对血液干细胞进行 TVEMF 扩增，直至每单位体积中 TVEMF 扩增血液干细胞的数目是置于 TVEMF 生物反应器中的每单位体积中血液干细胞数目的 7 倍以上；和
 - c. 将 TVEMF 扩增细胞与可药用载体混合以形成药物血液干细胞组合物。
8. 根据权利要求 7 的方法，还包括从 TVEMF 扩增细胞中除去有毒物质。
9. 根据权利要求 7 的方法，其中所述 TVEMF 为约 0.05 到约 6.0 高斯。

10. 根据权利要求7的方法,其在将血混合物置于 TVEMF 生物反应器中之前还包括收集血的步骤,其中所述血收集自自体来源。
11. 根据权利要求7的方法,其在将血混合物置于 TVEMF 生物反应器中之前还包括收集血的步骤,其中所述血收集自异体来源。
12. 根据权利要求11的方法,其在将血混合物置于 TVEMF 生物反应器中之前还包括收集血的步骤,其中所述血收集自哺乳动物、血库、医院和低温保存血样中至少一种。
13. 根据权利要求7的方法,其中所述血混合物包含与其他血液成分分离的 CD34+/CD38-血液干细胞。
14. 根据权利要求7的方法,其中所述血混合物包含与其他血液成分分离的血沉棕黄层。
15. 根据权利要求7的方法,其中所述血混合物不含红细胞。
16. 根据权利要求2的方法,其中施用于哺乳动物的 TVEMF 扩增血液干细胞的治疗有效量是约 20 ml, 每 ml 约 10^7 到约 10^9 个细胞。
17. 用于修复哺乳动物心脏组织的血液干细胞药物组合物,所述组合物包含扩增的血液干细胞,其在每单位体积中的数目是天然血中的至少 7 倍,并且其中所述血液干细胞具有与天然血中的干细胞基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。
18. 用于修复哺乳动物心脏组织的血液干细胞药物组合物,所述组合物包含 TVEMF 扩增的血液干细胞,其在每单位体积中的数目是天然血中的至少 2 倍,并且其中所述血液干细胞具有与天然血中的干细胞基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。
19. 根据权利要求18的血液干细胞药物组合物,其中每单位体积中 TVEMF 扩增的血液干细胞的数目是至少 7 倍。
20. 根据权利要求19的组合物,其中所述组合物还包含选自以下的至少一种可药用载体: 血浆、血、白蛋白和含有 5% 人血清白蛋白的盐水。
21. 根据权利要求17到20中任一项的组合物在制备用于修复心脏组织的药物中的用途。

用于修复心脏组织的方法和组合物

发明领域

本发明涉及修复和/或再生心脏组织的方法以及实现这种修复和/或再生的组合物。

发明背景

哺乳动物尤其是人类心脏组织的再生长期以来是医学界的期望。就一些组织而言，人体组织的修复大部分是依靠移植来自供体的相似组织来实现。组织移植基本上是以自 Herrick 双胞胎中一个到另一个的肾脏移植开始的，后来，南非医生 Christian Barnard 在 1967 年 12 月 3 日将 Denise Darval 的心脏移植给 Louis Washkansky，这使得这一技术举世闻名，从此组织移植成为了用于延长晚期病人寿命的广泛接受的方法。

人体组织移植从其最初应用开始就遇到了重大问题，主要是由于身体的天然免疫系统而产生的组织排斥。这经常造成应用组织移植仅能延长非常有限的寿命（Washkansky 手术后只活了 18 天）。为了克服身体免疫系统的问题，很快开发出了许多抗排斥药（比如 Imuran、环孢霉素）以抑制免疫系统并因此延长组织在排斥之前的应用。但是，排斥问题仍然产生了对组织移植替代方法的需求。

近年来，研究人员使用多能性胚胎干细胞作为组织移植的替代方案进行了实验。使用胚胎干细胞所基于的理论是它们在理论上能够用于再生身体内几乎任何组织。然而，胚胎干细胞在组织再生上的应用也遇到了问题。在这些问题中较为严重的有，所移植的胚胎干细胞的可控性有限，它们有时生长成为肿瘤，并且可用于研究的人胚胎干细胞将受到患者免疫系统的排斥（Nature, June 17, 2002: Pearson, “Stem Cell Hopes Double”, news@nature.com, published online: 21 June 2002）。另外，胚胎干细胞的广泛应用还负担了伦理、道德和政治因素，使得其广泛应用仍然存在疑问。

干细胞的多能性特点首先在骨髓中得到的成体干细胞中发现。Verfaillie, C.M. et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells

derived from adult marrow. *Nature* 417, published online 20 June; doi: 10.1038/nature00900, (2002) cited by Pearson, H. Stem cell hopes double. news@nature.com, published online: 21 June 2002; doi: 10.1038/news020617-11.

Boyse et al., 美国专利 No. 6,569,427 B1 公开了低温保存以及低温保存的胎儿和新生儿血液可用于治疗或预防多种疾病与病症如贫血、恶性肿瘤、自身免疫病和多种免疫功能障碍及缺陷。Boyse 还公开了使用异源基因序列的造血重建在基因治疗中的应用。但是, Boyse 的公开缺乏用于治疗应用的细胞扩增。脐带血库 CorCell 提供了对脐带血干细胞扩增、低温保存和移植的统计。“Expansion of Umbilical Cord Blood Stem Cells”, Information Sheet Umbilical Cord Blood, CorCell, Inc. (2003). 一种扩增方法公开了使用一种生物反应器, 所述生物反应器具有位于中央的基于胶原蛋白的基质。Research Center Julich: Blood Stem Cells from the Bioreactor. Press release May 17, 2001.

研究继续致力于阐明干细胞扩增中涉及的分子机制。例如, CorCell 的文章公开了, 名为 Δ -1 的信号分子辅助脐带血干细胞的发育。Ohishi K. et al., Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34+/CD38- cord blood cells. *Clin. Invest.* 110:1165-1174 (2002).

因此, 需要提供不基于器官移植或应用胚胎干细胞的修复心脏组织的方法。

发明概述

本发明涉及修复心脏组织和补充心脏细胞的方法, 其具体通过使用血液干细胞组合物和身体的自我修复能力来实现, 所述组合物包含来源于 TVEMF 扩增的血液的成体干细胞, 优选经 TVEMF 扩增。用于治疗需要心脏修复的哺乳动物(优选人)的本发明方法包括将治疗有效量的来源于血液的经扩增成体干细胞引入哺乳动物, 所述成体干细胞经过 TVEMF 扩增, 且每单位体积中的细胞数是其来源的血液中的每单位体积中细胞数的至少七倍, 其中经 TVEMF 扩增的干细胞保持其三维几何结构(three-dimensional geometry)及其细

胞-细胞支持 (cell-to-cell support) 以及细胞-细胞三维结构 (cell-to-cell geometry)。所述方法包括在足以允许人体系统利用所述血细胞有效修复受损心脏组织的时间中进行这样的引入。

本发明还部分涉及来自哺乳动物 (优选人) 的用于修复心脏组织的血液干细胞组合物, 优选地, 其中所述干细胞经过 TVEMF 扩增。本发明还涉及来自哺乳动物 (优选人) 的血液干细胞, 其中所述干细胞单位体积中的数目是它们来源材料 (例如, TVEMF 扩增之前干细胞的血来源) 的至少 7 倍; 并且其中所述血液干细胞的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构与天然 (优选来源的) 血中的干细胞相同或基本相同。这些细胞优选通过本文所述的 TVEMF 扩增方法制得。本发明也涉及包含这些细胞的组合物, 其按照需要添加其它成分, 包括可药用载体、低温保存剂和细胞培养基。

本发明还涉及通过以下步骤制备用于修复心脏组织的干细胞和干细胞组合物的方法: 将血混合物置于 TVEMF 生物反应器的培养室中, 对血混合物施加 TVEMF, 以及在 TVEMF 生物反应器中 TVEMF 扩增血液干细胞以制备经 TVEMF 扩增的血液干细胞和干细胞组合物。优选地, 施加在细胞上的 TVEMF 为约 0.05 高斯到约 6.0 高斯。本发明还涉及通过以下步骤低温保存所述经扩增干细胞的方法: 将其温度降低至 -120°C 到 -196°C 并持续一年或更长, 之后将温度升高到适于将所述细胞引入哺乳动物的温度。

本文也包含了用于修复心脏组织的组合物, 以及这种组合物和/或扩增的血液干细胞本身在制备用于修复或再生心脏组织的药物中的用途。

附图简述

附图中,

图 1 以示意图方式举例说明了生物反应器的培养载体流程 (flow loop) 的一个优选实施方案;

图 2 是本发明的 TVEMF 生物反应器的一个优选实施方案的侧视图;

图 3 是图 2 的 TVEMF 生物反应器的一个优选实施方案的侧面投影图;

图 4 是 TVEMF 生物反应器的一个优选实施方案的俯视截面图；

图 5 是 TVEMF 生物反应器的俯视横截面图；

图 6 是随时间变化电磁力装置的侧视图，该装置能容纳生物反应器并向生物反应器提供随时间变化的电磁力；

图 7 是图 6 所示装置的前视图；

图 8 是图 6 所示装置的前视图，进一步显示其中的生物反应器。

附图详述

用最简单的话来说，旋转式 TVEMF 生物反应器包含细胞培养腔室和随时间变化的电磁力源。在运行中，血混合物被置于细胞培养腔室中。细胞培养腔室旋转一段时间，在此期间，随时间变化电磁力源在腔室内产生随时间变化的电磁力。在该期间结束时，将 TVEMF 扩增的血混合物从腔室移出。在较复杂的 TVEMF 生物反应器系统中，随时间变化电磁力源可以集成到 TVEMF 生物反应器，如图 2-5 所示，但是也可与生物反应器相邻，如在图 6-8 中。另外，向细胞提供支持的流体载体如培养基或缓冲液（优选与下文讨论的加入血混合物的培养基相似）可以周期性更新和移出。本文描述优选的 TVEMF 生物反应器。

现在参看图 1，其展示了在一个完整的用于培养哺乳动物细胞的生物反应器培养系统中培养载体流程 1 的一个优选实施方案，所述生物反应器培养系统带有细胞培养腔室 19，优选旋转式细胞培养腔室，充氧器 21，辅助培养载体定向流动的装置，优选通过使用主泵 15，以及供应多支管 17，其选择性输入这种培养载体需求，例如但不限于营养物 3、缓冲剂 5、新鲜培养基 7、细胞因子 9、生长因子 11 以及激素 13。在此优选实施方案中，主泵 15 提供新鲜流体载体到充氧器 21，流体载体在此被充入氧气并且通过细胞培养腔室 19。来自细胞培养腔室 19 的已使用流体载体中的废物被移去并传送到废物 18，剩下的细胞培养载体返回到多支管 17，必要时它在此接受新鲜补充，之后使用泵 15 通过充氧器 21 循环到细胞培养腔室 19。

在培养载体流程 1 中，培养载体通过腔室 19 中的活细胞培养物并且围绕如图 1 所示的培养载体流动回路 1 循环。在此回路 1 中，根据化学传感器（未显示）进行调节，以维持细胞培养反应器腔室

19 中的恒定条件。控制二氧化碳压力并引入酸或碱以校正 pH 值。氧气、氮气和二氧化碳溶解在气体交换系统（未显示）中，以支持细胞呼吸。闭合回路 1 添加氧气，并从循环气体容量中移去二氧化碳。尽管图 1 是可用于本发明的培养载体流动回路的一个优选实施方案，但是本发明并不限于此。可以手动、自动或者通过其他控制手段向生物反应器输入培养载体例如但不限于氧气、营养物、缓冲剂、新鲜培养基、细胞因子、生长因子和激素，比如可以类似于废物和二氧化碳的控制和移除。

图 2 和 3 展示了带有集成的随时间变化电磁力源的 TVEMF 生物反应器 10 的一个优选实施方案。图 4 是以优选方式用于本发明的一种旋转式 TVEMF 生物反应器 10 的横截面图。图 4 的 TVEMF 生物反应器 10 举例说明带有集成的随时间变化电磁力源。图 5 也举例说明带有集成的随时间变化电磁力源的 TVEMF 生物反应器的一个优选实施方案。图 6-8 显示带有相邻的随时间变化电磁力源的旋转式生物反应器。

现在转到图 2，图 2 展示的是本发明的 TVEMF 生物反应器 10 的一个优选实施方案的侧视图。图 2 包含由基座 112 支撑的马达外罩 111。马达 113 位于马达外罩 111 内部，且通过第一线 114 和第二线 115 连接至其内带有控制装置的控制盒 116，由此通过转动控制钮 117 可对马达 113 的转速进行增量控制。马达外罩 111 内部设置有马达 113，使得马达轴 118 纵向穿过外罩 111 延伸，且马达轴 118 是径向的，使得轴 118 的中心与在径向腔室 119 位置的地球平面平行，优选地用包括但不限于塑料的透明材料制成。

在此优选实施方案中，径向腔室 119 连接到轴 118 使得腔室 119 围绕径向轴旋转，而径向轴与水平面平行。腔室 119 被线圈 120 所缠绕。线圈 120 的尺寸和缠绕圈数使得，当优选为 0.1 mA 到 1000 mA 的方波电流供应在线圈 120 上时，在腔室 119 内产生优选为 0.05 高斯到 6 高斯的随时间变化的电磁力。线圈 120 在轴 118 的末端通过线 123 和 124 连接至第一环 121 和第二环 122。然后，环 121 和 122 与第一电磁传送线 125 和第二电磁传送线 128 相接触，使得腔室 119 可以旋转同时电流恒定地供应到线圈 120 上。电磁发生装置 126 与线 125、128 相连接。通过旋转电磁发生装置钮 127 调节其输出，从

而使得电磁发生装置 126 提供方波到线 125、128 和线圈 120 上。

图 3 是可用于本发明中的图 2 所示 TVEMF 生物反应器 10 的侧面投影图。

现在转到图 4 展示的带有培养腔室 230 的旋转式 TVEMF 生物反应器 10，该腔室优选是透明的，并且适于在其中含有血混合物，另外包含外壳 220，其包括第一 290 和第二 291 圆柱形横向末端帽构件，该构件与第一 228 和第二 229 末端表面相对，末端表面设置成安装内部圆柱管状玻璃构件 293 和外部管状玻璃构件 294。提供合适的压力密封。在内部 293 与外部 294 管状构件之间是环形线加热器 296，其用于获得细胞生长的合适的培养温度。所述线加热器 296 也可用作随时间变化的电磁力装置，用以给培养腔室 230 提供随时间变化的电场，或者，如图 5 所述，独立的线圈 144 可用于提供随时间变化的电磁力。第一末端帽构件 290 和第二末端帽构件 291 具有内部弯曲表面，其与末端表面 228、229 相邻，以促进腔室 230 内的混合物流动更平滑。第一末端帽构件 290 和第二末端帽构件 291 分别具有第一中央流体传递轴颈构件 292 和第二中央流体传递轴颈构件 295，其分别旋转式安装在输入轴 223 和输出轴 225 上。每个传递轴颈构件 294、295 具有凸缘以承载在末端帽构件 290、291 中的凹陷沉孔中，并且其上附着第一锁紧垫圈环 297 和第二锁紧垫圈环 298 以防止相对于轴 223、225 的径向运动。每个轴颈构件 294、295 具有中间环形凹陷，其与径向扩展的、沿圆周布置的通道相连。轴颈构件 292、295 上的每个环形凹陷通过末端帽构件 290 和 291 中的第一放射状设置通道 278 和第二放射状设置通道 279 分别与第一输入偶合件 203 和第二输入偶合件 204 相偶合。放射状通道 278 或 279 中的载体流动通过轴颈构件 294 或 295 中的第一环形凹陷和径向通道，以允许载体通过轴颈构件 292、295 进入到达轴颈 292、295 的每个末端，在此其进入围绕轴 223、225。

附着在末端帽构件 290 和 291 的是包含滚珠轴承的第一管状轴承支架 205 和第二管状轴承支架 206，该滚珠轴承相对地支撑输入轴 223 和输出轴 225 上的外部支架 220。第一轴承支架 205 具有附着的第一链轮 210，其用于为外部支架 220 提供旋转驱动，其旋转方向围绕输入轴 223 和输出轴 225 以及径向轴 221。第一轴承支架 205 和第

二轴承支架 206 也具备从线加热器 296 和任何其它传感器向外供电的功能。

内部滤器装置 235 包括内部管状组件 215 和外部管状组件 216, 其沿它们的长度方向具有孔或洞, 该装置有带孔的第一 217 和第二 218 内部滤器装置末端帽组件。内部管状组件 215 构建成两部分, 其两部分带有互锁的位于中央的偶合部分, 其每一部分分别附着于末端帽 217 或 218。外部管状组件 216 设置在第一 217 和第二内部滤器装置末端帽组件之间。

所述末端帽组件 217、218 分别被旋转式支持在输入轴 223 和输出轴 225 之上。内部组件 215 通过钉和中央定位的 (interfitting) 凹槽 219 旋转式附着至输出轴 225。十微米织法的聚酯布 224 布置在外部组件 216 的外表面之上, 并且附着在任一末端的 O 环。因为内部组件 215 被偶合钉附着在输出驱动轴 225 上的槽, 所以输出驱动轴 225 可旋转内部组件 215。所述内部组件 215 与第一 217 和第二 218 末端帽相偶合, 所述帽支持外部组件 216。输出轴 225 延伸通过第一静止支架 240 中的轴承, 并与第一链轮 241 相偶合。如举例所示, 输出轴 225 具有管状孔 222, 其从位于密封之间的第一静止支架 240 中的第一端口或通道 289 延伸至内部组件 215, 使得流体载体的流动可从内部组件 215 中通过静止支架 240 而退出。

内部组件 235 的第一 217 和第二 218 末端帽与外部支架 220 中的轴颈 292、295 之间是叶片组件 50a 和 50b 的第一 227 和第二 226 毂。在输入轴 223 上的第二毂 226 通过钉 231 偶合至输入轴 223, 使得第二毂 226 随输入轴 223 旋转。每个毂 227、226 具有轴向延伸的通道, 用于传送载体使之穿过毂。

输入轴 223 延伸穿过第二静止支架 260 中的轴承, 该支架用于旋转式支持输入轴 223。第二径向通道 267 延伸穿过输入轴 223 到保持垫圈和环的过渡位置, 所述垫圈和环设置在面板与支架 260 之间的第二环状凹陷 232 中。第二末端帽组件 291 中的第三放射状通道 272 允许凹陷中流体载体从第二末端帽组件 291 中退出。尽管没有显示, 第三通道 272 通过管线和 Y 型接头连接至通道 278 和 279 的每个。

图 4 中显示样品端口，其中沿第一轴延伸的第一钻孔 237 与腔室 230 的角 233 相交，形成受限的开口 234。该钻孔 237 在一端带有沉孔和带螺纹的环，以螺纹形容容纳圆柱形阀组件 236。阀组件 236 具有互补成形的顶端，以接合开口 234 并稍微突出到腔室 230 的内部。阀组件 236 上的 O 环 243 提供密封。沿第二轴的第二钻孔 244 与第一钻孔 237 相交在 O 环 243 与开口 234 之间的位置。弹性体或塑料阻塞物 245 封闭了第二钻孔 244，并且可用皮下注射器进入用以取样品。为了取样品，阀组件 236 向后移，以使得开口 234 和钻孔 244 可以进入。然后可使用注射器提取样品，开口 234 可被重新封闭。没有外部污染到达 TVEMF 生物反应器 10 的内部。

在运行中，载体输入到第二端口或通道 266，而后到轴通道，由此通过第三放射状通道 272 到达第一放射状设置的通道 278 和第二放射状设置的通道 279。当载体通过轴颈 292、294 中的径向通道进入腔室 230 时，载体撞击在毂 227、226 的末端表面 228、229 上，并放射状以及轴向分散而通过毂 227、226 中的通道。通过毂 227、226 的载体撞击在末端帽组件 217、218 上，并且放射状分散开来。进入流体载体的液流因此放射状向外离开径向轴 221，并以螺旋管形式流动，通过聚酯布 224 以及滤器装置 235 中的开口从每个末端退出，以经过通道 266 和 289 退出。通过控制外部支架 220、腔室 230 和内部滤器装置 235 的旋转速度和旋转方向，可获得任何期望类型的载体动作。然而，很重要的是可以在连续供应新鲜流体载体的同时获得回转器操作这一事实。

如果不使用集成式环形线加热器 296 施加随时间变化的电磁力，可通过另一个优选的随时间变化电磁力源进行施加。例如，图 6-8 举例说明了随时间变化电磁力设备 140，其提供电磁力给生物反应器中的细胞培养物，所述生物反应器不带有集成式随时间变化电磁力、而是带有相邻的随时间变化电磁力装置。具体地，图 6 是随时间变化电磁力装置 140 的一个优选实施方案。图 6 是装置 140 的侧面投影图，其中包含支持基座 145，支持在基座 145 之上的圆柱体线圈支持物 146，其中线圈 147 围绕支持物 146 缠绕。图 7 是图 6 中举例说明的随时间变化电磁力装置 140 的前投影图。图 8 是随时间变化电磁力装置 140 的前投影图，其举例说明在运行中整个生物反应器 148

放入圆柱体线圈支持物 146 中, 该支持物 146 由支持基座 145 所支持并由线圈 147 所缠绕。因为随时间变化电磁力装置 140 邻近生物反应器 148, 随时间变化电磁力装置 140 可重复使用。另外, 因为随时间变化电磁力装置 140 邻近生物反应器 148, 装置 140 可用于在所有类型的生物反应器中产生电磁力, 优选旋转型。

运行中, 在 TVEMF 扩增期间, 本发明的 TVEMF 生物反应器 10 在细胞培养腔室中包含血混合物。在 TVEMF 扩增期间, 可以评估并调节含有血混合物的腔室的旋转速度, 以使得血混合物基本上保持在径向轴处或者在径向轴周围。确保提高转速以防止与壁撞击。例如, 如果血混合物中的血液干细胞在旋转循环的向下侧时过分向内向下落以及在旋转循环的向上侧时过分向外并且不充分向上, 则优选提高转速。最优情况下, 建议用户优选地选择旋转速率以使得壁碰撞频率和强度尽可能小, 从而维持血液干细胞的三维几何结构以及它们的细胞-细胞支持和细胞-细胞几何结构。本发明优选的速率是从 5 到 120 RPM, 更优选从 10 到 30 RPM。

血混合物可优选地通过优选为透明的培养腔室视觉上评价, 并手动调节。血混合物的评价和调节也可通过传感器(例如, 激光)自动进行, 该传感器监测血液干细胞在 TVEMF 生物反应器 10 中的位置。指示过多细胞运动的传感器读数将自动引起相应调节转速的机制。

另外, 在运行中, 本发明预期电磁发生装置被打开并调节, 使得方波输出在含有血混合物的腔室中产生期望的电磁场, 优选在 0.05 高斯到 6 高斯的范围。

优选地, 所述方波具有约 2 到约 25 周/秒的频率, 更优选约 5 到约 20 周/秒, 例如约 10 周/秒, 并且导体的 RMS 值为约 1 到 1000 mA, 优选 1 到 6 mA。但是, 这些参数并不意在限制本发明的 TVEMF, 因为它们可基于本发明的其它方面而变化。例如, 可通过标准设备比如 EN131Cell Sensor Gauss Meter 测量 TVEMF。

按照本发明所预期, 在不偏离本发明范围的情况下, 可对受到随时间变化电磁力的旋转式生物反应器作出多种改变, 因此上文描述中所含的所有内容应该被理解为举例说明, 而不是限制。

本发明优选实施方案详述

本发明涉及修复、补充和再生人体中心脏组织的方法。本发明可通过下文所述优选实施方案更完整的进行描述，但并不仅限于此。

在本发明的优选实施方案中描述了制备成体干细胞的方法，所述干细胞可协助身体修复、替换和再生心脏组织。从患者体内移出血细胞。这些细胞的亚群目前称为成体干细胞。将所述血细胞（包括成体干细胞）置于如本文所述的生物反应器中。所述生物反应器容器以一定速度旋转，使得血细胞悬浮以维持其三维几何结构及其细胞-细胞支持和几何结构。在所述细胞在所述反应器中的时间内，可以对其提供营养物，使其暴露于激素、细胞因子或生长因子，和/或进行遗传修饰，并且优选除去有毒物质。通常所除去的有毒物质是来自血细胞，其包括濒死细胞的有毒颗粒物以及颗粒细胞和巨嗜细胞的有毒物质。扩增这些细胞的亚群，产生大量细胞。所述细胞的扩增是受控的，使得这些细胞在足够的时间里（优选在七天内）扩增至少七倍。接着将所述细胞静脉注射或直接注射进待修复的心脏组织中或者与其紧邻部位，使身体的天然系统修复和再生心脏组织。另外，在此方法中，可对血液干细胞进行操作以改变其治疗特征，优选通过对所述细胞进行遗传修饰。

下文的定义意在辅助描述和理解本发明内容中所定义的术语。这些定义并不意味将这些术语限制在少于通过本申请所描述的内容。另外，关于 TVEMF 包括几种定义，在此方面的所有定义应被理解为互相补充，而不应理解为互相抵触。

本申请全篇中使用的术语“成体干细胞”指多能性细胞，其是未分化的且能产生多种分化细胞。在本发明中，成体干细胞优选 CD34+/CD38-。成体干细胞也称为体细胞干细胞（somatic stem cells），并且不是直接来源于胚胎的胚胎干细胞。

本申请全篇中使用的术语“血”指哺乳动物中成体干细胞的两种主要来源：外周血或脐带血。“外周血”是全身性血，即哺乳动物中全身性循环的或者已循环的血。所述哺乳动物不指胎儿。就本发明目的而言，没有理由区分位于相同循环回路中不同部分的外周血。术语“脐带血”指来自胎儿或婴儿的脐带和/或胎盘的血。脐带血是已

知最丰富的干细胞来源之一。术语“脐带”不以任何方式将本发明的术语“脐带血”限制在来自脐带的血；胎儿或婴儿胎盘的的血与脐带的血是混合的。就本发明目的而言，没有理由区分位于相同循环回路中不同部分的血。

本申请全篇中使用的术语“血细胞”指来自血的细胞；“外周血细胞”指来自外周血的细胞；“脐带血细胞”指来自脐带血的细胞。能够复制的血细胞可经受 TVEMF 生物反应器中的 TVEMF 扩增，并可存在于本发明的组合物中。

本申请全篇中使用的术语“血液干细胞”指来自血的成体干细胞。血液干细胞是成体干细胞，其如上文所述也称为体细胞干细胞，而不是直接来源于胚胎的胚胎干细胞。优选地，本发明的血液干细胞是 CD34+/CD38-细胞。

本申请全篇中使用的术语“血液干细胞组合物”或其提法指本发明的血液干细胞，所述血液干细胞（1）其每单位体积数量是天然血液来源的至少 7 倍，并且具有与自然存在的血液干细胞相同或非常相似的三维几何结构和细胞-细胞几何结构和细胞-细胞支持，和/或（2）已经过 TVEMF 扩增，并保持了上述的三维几何结构和支持。本发明血液干细胞组合物中的血液干细胞与某种载体在一起，所述载体可以是可药用载体、血浆、血、白蛋白、细胞培养基、生长因子、铜螯合剂、激素、缓冲剂、低温保存剂或某种其它物质。涉及天然血时，优选将本发明的血液干细胞与其原始的血（即外周血、脐带血、混合外周血与脐带血或其它血）来源相比。但是，如果这一比较不可用，则天然血可指这些血的平均或典型特征（优选相同的哺乳动物物种）作为本发明血液干细胞的来源。

本发明的“血液干细胞药物组合物”是适于对哺乳动物优选人施用的血液干细胞组合物。这样的组合物包含治疗有效量的经扩增（优选 TVEMF 扩增）血液干细胞。经扩增的血液干细胞的治疗有效量（本文其它部分也有讨论）优选为至少 1000 个干细胞，更优选至少 10^4 个干细胞，还更优选至少 10^5 个干细胞，更优选至少 10^7 到 10^9 个干细胞或甚至更多的干细胞，比如 10^{12} 个干细胞。这些数量的经扩增干细胞可以以一次或多次剂量施用。如本申请全篇中所指出，施用于患者的干细胞的数量可能受限于根据本发明扩增增殖的来源

血中原始可用的干细胞数量。不限于理论地，相信在施用之后未被身体利用的干细胞将简单地通过天然身体系统除去。

本申请全篇中使用的术语“血混合物”指血/血细胞与辅助所述细胞扩增的物质的混合物，该物质比如用于细胞生长的培养基，该物质将放置于 TVEMF 生物反应器中（比如在细胞培养腔室中）。所述“血混合物”血细胞可简单地通过将全血与诸如细胞培养基之类的物质混合而存在于血混合物中。血混合物也可由本申请全篇中所述含有血液干细胞的来自血的细胞制备物（如“血沉棕黄层”）制成。优选地，血混合物包含 CD34+/CD38-血干细胞以及 Dulbecco's 培养基 (DMEM)。优选地，约一半的血混合物是细胞培养基如 DMEM。

本申请全篇中使用的术语“TVEMF”指“随时间变化的电磁力 (Time Varying Electromagnetic Force)”。如上文所讨论的，本发明的 TVEMF 是方波（遵循傅立叶曲线）。优选地，方波频率为约 10 周 / 秒，导体 RMS 值为约 1 到 1000 mA，优选 1 到 6 mA。但是，这些参数并不意在限制本发明的 TVEMF，因为这些可根据本发明的其它方面而变化。例如，可通过标准设备比如 EN131Cell Sensor Gauss Meter 进行测量 TVEMF。

本申请全篇中使用的术语“TVEMF 生物反应器”指施加 TVEMF 的旋转式生物反应器，如上文附图说明中所更详细描述。施加到生物反应器上的 TVEMF 优选在 0.05 到 6.0 高斯的范围内，优选 0.05-0.5 高斯。参阅如图 2、3、4 和 5，作为 TVEMF 生物反应器的实例（不意味着限制）。在一个简单的实施方案中，本发明的 TVEMF 生物反应器使得封闭的血混合物在适当的高斯水平下（根据施加的 TVEMF）旋转，并允许其中的血细胞（包括干细胞）扩增。优选地，TVEMF 生物反应器允许交换生长培养基（优选带有添加剂）并允许对血混合物充氧气。所述 TVEMF 生物反应器提供用于细胞生长数天或更多的机制。不限于任何理论地，所述 TVEMF 生物反应器使得反应器中的细胞受到 TVEMF，以使 TVEMF 穿过细胞或接触细胞，从而使细胞经历 TVEMF 扩增。在 TVEMF 扩增过程中，TVEMF 生物反应器优选以 5 到 120 rpm、更优选 10 到 30 rpm 的速率旋转，以使壁碰撞频率和强度尽可能小，从而维持血流细胞的三维几何结构以及细胞-细胞支持和细胞-细胞几何结构。

本申请全篇中使用的术语“TVEMF 扩增的血细胞”指在置于 TVEMF 生物反应器中并受到约 0.05 至 6.0 高斯的 TVEMF 之后每单位体积数量增加的血细胞。每单位体积数量上的增加是细胞在 TVEMF 生物反应器中复制的结果，使得生物反应器中细胞总数增加。每单位体积中细胞数量增加明确地不是因为流体体积的简单减少，例如，血液体积从 70 ml 减少到 10 ml 从而每 ml 细胞的数量增加。

本申请全篇中使用的术语“TVEMF 扩增的血液干细胞”指在置于 TVEMF 生物反应器并受到约 0.05 至 6.0 高斯的 TVEMF 之后每单位体积数量增加的血液干细胞。每单位体积干细胞数量上的增加是细胞在 TVEMF 生物反应器中复制的结果，使得生物反应器中干细胞总数增加。每单位体积中干细胞数量的增加明确地不是因为流体体积的简单减少，例如，血液体积从 70 ml 减少到 10 ml 从而每 ml 干细胞的数量增加。

本申请全篇中使用的术语“TVEMF 扩增”(TVEMF- expanding)指在 TVEMF (旋转)反应器中在 TVEMF 存在下 TVEMF 反应器中细胞进行复制(分裂并生长)的步骤。血液干细胞(优选 CD34+/CD38-干细胞)优选复制且不经进一步分化，使得所有或基本上所有根据本发明扩增的 CD34+/CD38-干细胞在其处于生物反应器中的时间内进行复制而不发生分化。“基本上所有”意在指至少 70%、优选至少 80%、更优选至少 90%、再优选至少 95%、再优选至少 97%、最优选至少 99%的 CD34+/CD38-细胞不发生分化而使其在 TVEMF 扩增过程中不再是 CD34+/CD38-。

本申请全篇中使用的术语“TVEMF 扩增”指通过让细胞受到约 0.05 到约 6.0 高斯的 TVEMF 而使 TVEMF 生物反应器中的血细胞(优选血液干细胞)数量增加的过程。优选地，血液干细胞数量的增加在每单位体积的数量上是原始血来源的至少 7 倍。根据本发明的 TVEMF 生物反应器中的血液干细胞的扩增提供了维持或具有与 TVEMF 扩增前血液干细胞相同或基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构的血液干细胞。TVEMF 扩增的其它方面也可提供本发明的血液干细胞的异乎寻常的特征。不限于理论地，TVEMF 扩增不只提供高浓度的维持三维几何结构和细胞-细

胞支持及几何结构的血液干细胞。不限于理论地，TVEMF 可以在 TVEMF 扩增期间影响干细胞的一些特性，例如上调促进生长的基因，或者下调阻止生长的基因。总之，TVEMF 扩增使得促进血液干细胞生长而不发生分化。

本申请全篇中使用的术语“TVEMF 扩增的细胞”指经历了 TVEMF 扩增过程的细胞。

本申请全篇中使用了术语“修复”、“补充”和“再生”。这些术语并不意在彼此抵触，而是涉及总体的组织修复。

在本申请全篇中，提到修复心脏组织、治疗心脏疾病、治疗心脏病症并不是排他性的，而是指组织修复的总体目标，其中组织中的改善源于施用本文讨论的干细胞。尽管本发明部分涉及有症状、可能危及生命的心脏疾病或病症，但是本发明也意在包括对较小修复的治疗，甚至是在哺乳动物（优选人）健康上的症状或问题被注意到之前，通过早期引入扩增的干细胞对心脏疾病/病症进行防止/预防。

本申请全篇中使用的术语“有毒物质”或者相关术语可指对细胞（优选血液干细胞）或者对患者有毒性的物质。具体地，术语有毒物质指死细胞、巨噬细胞以及可以是血中特有的或不常见的物质（如外周血中的镰刀状细胞、脐带血中的母体尿或者废物或者其它组织或废物）。其它有毒物质在本申请中有所讨论。从血液中除去这些物质是本领域中特别是将血制品引入患者的相关领域中公知的。

本申请全篇中使用的术语“骨髓采集术”指将针插入骨髓并抽取骨髓。这样的采集术是本领域公知的。

本申请全篇中使用的术语“自体”指供体（扩增之前血液干细胞的来源）和受体是同一哺乳动物的情况。本发明包括自体心脏组织的修复及补充。

本申请全篇中使用的术语“异体”指供体（扩增之前血液干细胞的来源）和受体不是同一哺乳动物的情况。本发明包括异体心脏组织的修复及补充。

本申请全篇中使用的术语“CD34+”指血细胞表面存在表面抗原（CD34）。在所有的发育状态下，CD34 蛋白都存在于造血干细胞的

表面。

本申请全篇中使用的术语“CD38-”指血细胞表面缺乏表面抗原 (CD38)。CD38 不存在于本发明干细胞的表面。

本申请全篇中使用的术语“细胞-细胞几何结构”指细胞的几何结构, 包括细胞彼此之间相对的间距、距离和物理关系。例如, 本发明的 TVEMF 扩增干细胞彼此保持与在体内相同的关系。所述扩增的细胞处于细胞之间自然间距的范围内, 这与例如无法保持这种距离的二维扩增容器相反。

本申请全篇中使用的术语“细胞-细胞支持”指一个细胞对相邻细胞提供的支持。例如, 在体内健康组织和细胞与其它细胞保持相互作用, 例如化学的、激素的、神经的 (可用/合适时) 相互作用。在本发明中, 这些相互作用维持在正常的功能参数范围内, 例如, 这意味着它们不会开始对其他细胞传送有毒或损伤信号 (除非这是天然血环境中存在的)。

本申请全篇中使用的术语“三维几何结构”指细胞在三维状态下的几何结构 (与其天然状态相同或非常近似), 这与例如在培养皿中培养的细胞的二维几何结构相反, 在培养皿中所述细胞变得扁平和/或伸展。

对于上述三个定义中的每一个而言, 涉及维持本发明干细胞的细胞-细胞支持和几何结构以及三维几何结构时, 术语“基本相同”指本发明的 TVEMF 扩增细胞中提供正常的几何结构和支持, 使得所述细胞不以例如失去功能、不能修复组织或者对其它细胞有毒或有害的方式发生改变。

关于上文所定义术语或其它本申请全篇中所使用术语的其它表述不意味着受到上述定义的限制, 而是可对这些定义作出贡献。在本申请全篇中提供了关于本发明多个方面的信息, 这并不意味着只限制在它所包含的章节, 而是意味着对从整体上理解本发明作出贡献。

本发明涉及提供 TVEMF 扩增的血液干细胞, 其用于修复、补充和再生心脏组织。本发明可通过如下文所描述的优选实施方案进行更完整的描述, 但是并不意在仅限于此。

操作方法-制备 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物

在本发明的优选实施方案中描述了用于制备 TVEMF 扩增的血液干细胞的方法，所述干细胞可协助身体修复、替换和再生心脏组织。

在此优选方法中，血收集自哺乳动物，优选灵长类哺乳动物，更优选人，例如按照本申请全篇所述和按照本领域已知完成，优选如本领域公知地通过注射器完成。血液可在收集后立即扩增并使用，或以扩增或未扩增的形式低温保存备用。只以不威胁到受试者的量取血。优选地，收集约 10 到约 500 ml 血；更优选约 100-300 ml，甚至更优选 150-200 ml。本发明的血收集不意味着限制，而是也可包括例如其它直接收集哺乳动物血的方法、合并来自一个或多个来源的血的方法、例如通过由商品或其它来源间接获得血的方法，包括例如来自“血库”的低温保存的外周血或脐带血或以其它方式保存的以备将来使用的血液。

当从哺乳动物直接收集时，一般将血抽入一个或多个注射器中，其中优选含有抗凝血剂。血可保存在注射器或者转移到其他容器中。接着可将血分离成其各个部分；白细胞、红细胞和血浆。这在离心机（旋转血液容器直至血分离的装置）中实现或者通过沉降（将沉淀物注入血液容器中以使血分离的过程）实现。其次，一旦血液被分离，红细胞（RBC）在底部，白细胞（WBC）在中间，血浆在顶部，则将白细胞移出用于保存。中间层也称为“血沉棕黄层”，含有目的血液干细胞；血的其它部分是不需要的。就一些库而言，这就将是它们处理的范围。但是，其它库会通过从 WBC 中移出单核细胞（在此情况下是白细胞的一个亚群）来继续处理血沉棕黄层。尽管不是所有人都赞同此方法，但其保存的较少，保存细胞所需的低温氮也较少。

分离血细胞的另一种方法是在分离器比如 Cobe Spectra 细胞分离器中对所有收集到的血进行一轮或多轮（优选三轮）连续的流式白细胞分离术。这一方法将具有一个细胞核的血细胞从其它血细胞中分离出来。干细胞是具有一个细胞核的组中的一部分。分离血细胞的其他方法是本领域已知的。

优选地，从血液样品中移除 RBC。尽管人们可能具有相同的 HLA 型（是干细胞移植所需的），但其也可能具有不同的血型。通过移除 RBC 可以使对干细胞移植的有害反应最小化。因此，通过除去 RBC，干细胞样品更有可能与更多的人相容。RBC 还可能在融化时破裂，释放出游离的血红蛋白。这种类型的血红蛋白可严重影响接受移植者的肾脏。另外，当 RBC 破裂时，干细胞的生存力降低。

同时，尤其是在低温保存血或将血转移至另一哺乳动物时，可以检测血以确保不存在传染病或遗传性疾病，比如 HIV/AIDS、肝炎、白血病或免疫疾病。如果存在这些疾病，则可弃用所述血，或在指出未来使用者需要考虑的相关风险后使用。

在本发明的另一实施方案中，血细胞可得自需要修复心脏的人或不需要修复的供体。在收集之前，在 3 天中每 12 小时使用 G-CSF 6 ng/kg 处理供体，然后第四天处理一次。在优选方法中，还施用相似量的 GM-CSF。接着从供体收集血，可以通过分离器如 Cobe Spectra 细胞分离器使供体的总血液体积进行 3 轮连续的流式白细胞分离术来分离 PBC。

在本发明的另一个实施方案中，血细胞可从供体获得。在收集之前，在 3 天中每 12 小时使用 G-CSF（优选以 0.3 ng 到 5 μ g 的量，更优选 1 ng/kg 到 100 ng/kg，再优选 5 ng/kg 到 20 ng/kg，再优选 6 ng/kg）处理供体，然后第四天处理一次。在优选方法中，还施用相似量的 GM-CSF。其它替代方案是单独使用 GM-CSF 或其它生长因子分子、白介素。接着从供体收集血，其可以以血液混合物整体使用或者首先如本申请全篇中所讨论地分离成细胞组分，其中包括干细胞（CD34+/CD38-）的细胞部分用于制备待扩增的血液混合物。细胞可被分离，例如，通过分离器如 Cobe Spectra 细胞分离器使供体的总血液体积进行 3 轮连续的流式白细胞分离术。优选地，将扩增的干细胞再引入同一供体，该供体需要修复心脏组织，如本文所述。但是，也可应用异体引入，如本文所述。其它收集前施用（pre-collection administration）对于本领域技术人员来说是显而易见的。

优选地，从血中除去红细胞，并将包括血液干细胞的剩余细胞与合适培养基一起置于 TVEMF 生物反应器中（见“血混合物”），如

本文所述。在本发明更优选的实施方案中，仅将上文所述的“血沉棕黄层”（其包括血液干细胞，如本文所述）细胞材料置于 TVEMF 生物反应器中。其它实施方案包括移除其他非干细胞以及血成分，以制备不同的血制备物。这些血制备物甚至可含有作为剩下的仅有血组分的 CD34+/CD38-血液干细胞。除去血细胞中的非干细胞类型可通过负性分离技术（negative separation techniques）来实现，其比如但不限于沉降和分离。许多负性分离方法是本领域公知的。但是，正性选择技术也可使用，并且在本发明中是优选的。用于除去血中多种组分和正性选择 CD34+/CD38-的方法是本领域中已知的，只要它们不裂解或者不可逆地损伤所需的血液干细胞就可以使用。例如，可应用对 CD34+/CD38-有选择性的亲和方法。优选地，从血中制备如上文所述的“血沉棕黄层”，然后从“血沉棕黄层”中分离出其中的 CD34+/CD38-细胞用于 TVEMF 扩增。

所收集的血或如上文所述的所需细胞部分必须置于 TVEMF 生物反应器中用于 TVEMF 扩增。如上文所讨论的，术语“血混合物”包括血（或者所需细胞部分，例如没有红细胞的血，或者优选从血中分离出的 CD34+/CD38-血液干细胞）与允许这些细胞扩增的物质的混合物，这些物质比如用于细胞生长的培养基，其将置于 TVEMF 生物反应器中。细胞培养基、允许细胞生长和扩增的培养基是本领域公知的。优选地，允许细胞扩增的物质是细胞培养基，更优选是 Dulbecco's 培养基。显然，细胞培养基的组分必须不杀死或损伤细胞。在 TVEMF 扩增之前或期间，其它组分也可添加到血混合物中。例如，可将血置于带有 Dulbecco's 培养基的生物反应器中，并且另外添加 5%（或者其它所需量，比如在约 1%到 10%的范围）人血清白蛋白。也可在将血置于生物反应器中之前，在生物反应器外部或内部在血中加入血混合物的其它添加物，包括但不限于生长因子、铜螯合剂、细胞因子、激素和其它可增强 TVEMF 扩增的物质。优选地，来自一名个体的血收集物的全部体积（优选人血的量为约 10 ml 到约 500 ml，更优选约 100 ml 到约 300 ml 血，再优选约 150 ml 到约 200 ml 血）与约细胞培养基如 Dulbecco's 培养基（DMEM）混合，并且添加 5%人血清白蛋白，以制备用于 TVEMF 扩增的血混合物。例如，对于 50 到 100 ml 血样品，优选使用约 25 到约 100 ml DMEM/5%人血清白蛋白，使得血混合物的总体积在置于生物反应

器时为约 75 到约 200 ml。作为一般规则，收集的血越多越好；如果从一个个体收集了超过 100 ml，则优选使用所有的这些血。在可获得更大体积的情况下，例如通过合并（来自相同或不同来源的）血，可以优选多于一个剂量。当合并血收集物并一起 TVEMF 扩增时，使用灌注式 TVEMF 生物反应器是特别有用的。

本发明的铜螯合剂可以是任何无毒铜螯合剂，优选为青霉胺或盐酸曲恩汀。更优选地，青霉胺是溶于 DMSO 中的 D(-)-2-氨基-3-巯基-3-甲基丁酸（Sigma-Aldrich），以约 10 ppm 的量添加到血混合物中。从哺乳动物直接收集血时，也可对所述哺乳动物施用所述铜螯合剂。优选在从哺乳动物收集血之前一天以上、更优选两天以上进行这样的施用。铜螯合剂的目的是在 TVEMF 扩增之前降低血液中铜的量，无论是加入到血混合物或施用给血供体哺乳动物或者两者皆有。不限于理论地，相信可用铜量的减少可增强 TVEMF 扩增。

术语“置于 TVEMF 生物反应器中”没有限制性含义，血混合物可完全在生物反应器外部制成，然后再将混合物置于生物反应器中。血混合物也可全部在生物反应器内部混合。例如，可将血（或其细胞成分）置于生物反应器中并补充 Dulbecco's 培养基和 5% 人血清白蛋白，所述培养基和血清白蛋白预先存在于生物反应器中、与血同时添加到生物反应器中或者在血之后添加到生物反应器中。

本发明的优选血混合物包含以下成分：分离自血样品的血沉棕黄层的 CD34+/CD38- 干细胞和 Dulbecco's 培养基，含有 CD34+/CD38- 细胞的所述培养基总体积约为 150 - 250 ml，优选 200 ml。更优选地，血混合物中包含 G-CSF（粒细胞集落刺激因子）。优选地，G-CSF 的存在量足以增强血液干细胞的 TVEMF 扩增。更优选地，在 TVEMF 扩增之前血混合物中存在的 G-CSF 的量是约 25 到约 200 ng/ml 混合物，更优选约 50 到约 150 ng/ml 混合物，再优选是约 100 ng/ml。

TVEMF 生物反应器容器（含有包括血液干细胞的血混合物）以一定速度旋转，该速度使得血液干细胞悬浮并维持其三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。优选地，旋转速度为 5-120 rpm，更优选 10-30 rpm。这些速度并不意在限制，旋转速度将至少部分取决于生物反应器的类型和细胞培养腔室的尺寸以及其中放置

的样品。在细胞位于 TVEMF 生物反应器期间, 优选对其供应营养物和新鲜培养基(如 DMEM 和 5%人血清白蛋白, 见上文流体的讨论), 使其接触激素、细胞因子和/或生长因子(优选 G-CSF); 并除去有毒物质。从 TVEMF 生物反应器中的血细胞中除去的有毒物质包括垂死细胞的有毒颗粒物质以及粒细胞和巨噬细胞的有毒物质。细胞的 TVEMF 扩增受到控制, 使得细胞优选扩增(每单位体积的数量增加)至少七倍。优选地, 血液干细胞(以及其它细胞, 如果存在的话)经过至少 4 天的 TVEMF 扩增, 优选约 7 到约 14 天, 更优选约 7 到约 10 天, 再优选约 7 天。TVEMF 扩增可在 TVEMF 生物反应器中持续到长达 160 天。尽管 TVEMF 扩增甚至可长于 160 天, 但此种长度的扩增不是本发明的优选实施方案。

优选地, TVEMF 扩增在 TVEMF 生物反应器中以约 26 到约 41℃ 的温度实施, 更优选地, 以 37℃ 的温度实施。

监测正在经历 TVEMF 扩增的细胞的总体扩增的一个方法是通过视觉检查。血液干细胞一般为暗红色。优选地, 用于形成血混合物的培养基的颜色为浅色或无色。一旦生物反应器开始旋转并且施加 TVEMF, 细胞优选聚集在生物反应器容器中央, 培养基围绕在有颜色的细胞簇周围。通氧气和添加其它营养物通常不影响通过构建在生物反应器上的观察窗(一般是透明塑料的)观察细胞簇。簇的形成对于帮助干细胞保持它们的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构是重要的; 如果所述簇分散且细胞开始接触到生物反应器容器的壁, 则提高转速(手动或自动)使得中央的细胞簇可再次形成。在细胞簇形成后迅速测量可观察的细胞簇直径, 其可与此后的簇直径做比较, 以显示出 TVEMF 生物反应器中细胞大概的增长数。在 TVEMF 扩增期间细胞数量增加的测量也可以按照本领域已知用于常规生物反应器的许多方法进行。TVEMF 生物反应器中也可包括自动传感器, 以监测和测量簇尺寸的增加。

TVEMF 扩增过程可被仔细监测, 例如由实验室技术人员监测, 其将检查细胞簇的形成以确保细胞在生物反应器中保持成簇状态, 并且当细胞簇开始分散时将增加生物反应器的旋转。用于监测细胞簇和监测生物反应器内血混合物粘性的自动系统也可用于监测细胞簇。细胞簇粘性的改变在 TVEMF 扩增过程开始约两天后就可明显

观察到,并且可在该时间附近增加 TVEMF 生物反应器的旋转速度。TVEMF 生物反应器转速在 TVEMF 扩增过程中可以变化。优选地,适时改变旋转速度使得正在经历 TVEMF 扩增的细胞不与 TVEMF 生物反应器容器的侧面接触。

并且,在 TVEMF 扩增过程中,实验室技术人员可以例如一天一次、或每两天一次地人工(例如使用注射器)向生物反应器中加入新鲜培养基和优选的如上文所述其它所需添加剂如营养物和生长因子,并且抽出含有细胞废物和毒素的旧培养基。新鲜培养基和其它添加剂也可在 TVEMF 扩增期间自动泵入 TVEMF 生物反应器,废物则自动排出。

在置于 TVEMF 生物反应器并进行 TVEMF 扩增之后约 7 到约 14 天,血液干细胞可增加到它们初始数量的至少七倍。优选地,TVEMF 扩增持续约 7 到 10 天,更优选约 7 天。因此不需要在 TVEMF 扩增期间进行干细胞数量的测量。如上文及本申请全篇中所述,本发明的 TVEMF 扩增的血液干细胞具有与天然非 TVEMF 扩增的血液干细胞基本上相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。

TVEMF 扩增完成后,TVEMF 生物反应器中的细胞物质包含本发明组合物中的本发明干细胞。对于其他应用,可从组合物中除去或加入多种物质。本发明的另一个实施方案涉及离体哺乳动物血液干细胞组合物,其功能为协助身体系统或组织修复、补充和再生组织,例如,本申请全篇中描述的组织。所述组合物包含 TVEMF 扩增的血液干细胞,优选其数量为原始血液来源中每单位体积血液干细胞数量的至少 7 倍。例如,优选地,如果 X 数量的血液干细胞以某体积置于 TVEMF 生物反应器中,那么 TVEMF 扩增后,TVEMF 生物反应器中血液干细胞的数量将是至少 7X(不包括扩增过程中移出的细胞)。尽管这种至少 7 倍的扩增并不是实行本发明所必需的,但是这种扩增对于治疗目的而言是特别优选的。比如,需要时,TVEMF 扩增的细胞可以只是天然血中血液干细胞数量的 2 倍。优选地,TVEMF 扩增的细胞的范围为每单位体积天然血中干细胞数量的约 4 倍到约 25 倍。本发明还涉及包含来自哺乳动物的血液干细胞的组合物,其中所述血液干细胞每单位体积的数量是来自哺乳动

物的天然血中血液干细胞的至少 7 倍；并且其中所述血液干细胞具有与天然血中的干细胞相同或相似或基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。本发明的组合物可包含可药用载体；包括但不限于血浆、血、白蛋白、细胞培养基、生长因子、铜螯合剂、激素、缓冲剂或低温保存剂。“可药用载体”指允许将所述干细胞导入哺乳动物（优选人）的试剂。这种载体可包括本文提及的物质，具体地，包括任何可用于输血的物质，例如血液、血浆、白蛋白，还包括盐水或缓冲液（优选补充了白蛋白的缓冲液），优选来自待引入所述组合物的哺乳动物。术语将组合物“引入”哺乳动物意在指向动物“施用”组合物。优选地，通过静脉内对哺乳动物施用本发明的干细胞。但是，如本领域公知地，也可应用其它施用形式。具体地，可应用例如直接注射到心脏或心脏附近的组织，以使干细胞尽可能地接近受损位置。例如，就心脏病发作、心肌梗死的治疗而言，优选将只含有很少或不含除干细胞外其它细胞的干细胞组合物直接注射进心肌。甚至更优选地，这种注射还包含可接受量的 G-CSF，例如以 0.3 ng 到 5 μ g 的量，更优选 1 ng/kg 到 100 ng/kg，更优选 5 ng/kg 到 20 ng/kg，甚至更优选 6 ng/kg。施用干细胞可包含可药用载体，例如本领域的一般描述所述。“可用载体”通常指本发明血液干细胞可在其中存活的任何物质，即无论是 TVEMF 扩增之后、低温保存之前或之后、还是引入（施用）哺乳动物之前都对细胞没有毒性。这种载体是本领域公知的，并且可以包括多种物质，包括本申请全篇中就此目的描述的物质。例如，血浆、血、白蛋白、细胞培养基、缓冲剂和低温保存剂都是本发明的可用载体。期望的载体部分取决于期望的用途。

本领域已知的其它扩增方法（不使用 TVEMF）不提供血液干细胞在数量至少是天然血的至少七倍的扩增并且同时还保持血液干细胞三维几何结构和细胞-细胞支持不变。TVEMF 扩增的血液干细胞具有与所来源血相同或基本相同的三维几何结构和细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构，或保持其不变。所述组合物包含 TVEMF 扩增的血液干细胞，优选地悬浮在 Dulbecco's 培养基中或者在准备用于低温保存的溶液中。所述组合物优选不含有毒颗粒物质，例如垂死细胞以及粒细胞和巨噬细胞的有毒物质或内容物。所述组合物可以是包含 TVEMF 扩增的血液干细胞的低温保存组合物，这是通过

降低组合物到-120℃到-196℃的温度,并且保持低温保存组合物在此温度范围直到其用于治疗或其它应用。如下文所讨论地,优选在低温保存之前尽可能多的从组合物中除去有毒物质。

本发明的另一个实施方案涉及使用 TVEMF 扩增血液干细胞药物组合物再生心脏组织的方法,所述血液干细胞组合物是经过低温保存的或者是刚刚完成 TVEMF 扩增的。可通过如静脉内注射或直接注射到待修复的组织来将细胞引入哺乳动物体内(优选人),以允许身体的天然系统修复和再生组织。优选地,引入哺乳动物身体的组合物不含有毒物质以及可造成对所施用 TVEMF 扩增的血液干细胞有不利反应的其它物质。当治疗或研究需要个体血细胞,尤其是如果已经发生疾病并且需要无该疾病的细胞时,所述细胞可便利地用于所述治疗或研究。对于例如在生命后期需要修复心脏的人来说,保存的扩增外周血或脐带血可能是有用的。如果儿童有发生心脏病症或需要修复心脏组织的倾向,则特别需要脐带血。

实施例 1-TVEMF 生物反应器中细胞的实际 TVEMF 扩增

收集外周血并如表 1 所示扩增外周血细胞,描述如下。

A) 收集与维持细胞

如上文所述通过注射器从 15 个人类供体中收集人外周血(75 ml; 约 0.75×10^6 个细胞/ml),将收集自 10 个供体的血悬浮在 75 ml 的 Iscove's 改良的 Dulbecco's 培养基(IMDM)(GIBCO, Grand Island, NY)中以制备血混合物,所述培养基中补充了 20% 的 5% 人白蛋白(HA),100 ng/ml 重组人 G-CSF (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) 和 100 ng/ml 重组人干细胞因子(SCF)(Amgen)。将每个血样留下一部分作为“对照”样品。将外周血混合物置于如本文图 2 和 3 所示的 TVEMF 生物反应器中。TVEMF 扩增在 37℃, 6% CO₂ 及正常空气中 O₂/N 比例下进行。TVEMF 生物反应器最初以 10 转/分钟(rpm)的速度旋转,然后如本申请所述按需要进行调节,以保持外周血细胞悬浮在生物反应器中。对生物反应器施加 6 mA 随时间变化的电流。对外周血混合物施加的方波 TVEMF 约为 0.5 高斯。(频率:约 10 周/秒)。TVEMF 生物反应器中外周血混合物中的培养基每一到两天进行更换/更新。在第 10 天,将细胞从

TVEMF 生物反应器中移出，用 PBS 洗涤并进行分析。结果示于表 1。对照数据指没有进行扩增的人外周血样品；扩增样品指 TVEMF 扩增后的各个对照样品。

表 1

对照 1	细胞计数 300,000	成活力 98%
对照 2	细胞计数 325,000	成活力 100%
对照 3	细胞计数 350,000	成活力 98%
对照 4	细胞计数 300,000	成活力 98%
对照 5	细胞计数 315,000	成活力 99%
对照 6	细胞计数 320,000	成活力 98%
对照 7	细胞计数 310,000	成活力 98%
对照 8	细胞计数 340,000	成活力 100%
对照 9	细胞计数 300,000	成活力 98%
对照 10	细胞计数 320,000	成活力 98%
扩增样品1	细胞计数 3,000,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 99%
扩增样品2	细胞计数 3,500,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 100%
扩增样品3	细胞计数 3,750,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 98%
扩增样品4	细胞计数 3,250,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 98%
扩增样品5	细胞计数 3,450,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 100%
扩增样品6	细胞计数 3,400,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 98%
扩增样品7	细胞计数 3,200,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 98%
扩增样品8	细胞计数 3,500,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 100%
扩增样品9	细胞计数 3,150,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 98%
扩增样品10	细胞计数 3,500,000 对应CD34+ 增加: 是	成活力 99%

从表 1 中可以看出, 与未扩增的对照相比, 外周血细胞的 TVEMF 扩增使得其细胞数量在 10 天里增加了约 10 倍, CD34+ 细胞也有相应地增加。细胞生长的培养基每 1-2 天更换/更新一次。

B) 分析 TVEMF 扩增的细胞

使用计数板 (例如血细胞计数器之类的装置, 其使用是通过将

一定体积的对照细胞悬浮液或扩增样品置于特制的带有微网的显微镜载玻片上，并对样品中的细胞数进行计数）获得对照和扩增样品的总细胞计数。对照样品和 TVEMF 扩增 10 天后的扩增样品中的总细胞计数的结果在表 1 中显示。

如下测定表 1 中显示的相应 CD34+的增加：使用人 CD34 选择试剂盒（EasySep 阳性选择，StemCell Technologies）将扩增样品中的 CD34+细胞与其它细胞分离开，并如上文所述使用计数板进行计数，然后使用 FACSscan 流式细胞仪（Becton-Dickinson）进行确认。通过克隆发生测定对 CFU-GEMM 和 CFU-GM 进行计数。通过台盼兰排除测试测定细胞成活力（其中成活细胞是活细胞，非成活细胞是死细胞）。在所有扩增样品中，答案“是”表示 CD34+细胞以与总细胞计数相应的量增加。

C) 造血集落形成细胞的量的增加

在此 TVEMF 扩增组织培养系统中孵育供体的外周血细胞显著增加了造血集落形成细胞的数目。在独立实验中测定时，观察到最多至第 7 天的 CFU-GM（最高为 7 倍）和 CFU-GEMM（最高为 9 倍）集落形成细胞数目的持续增长，没有明显的平台期。

D) CD34+细胞的增加

在此 TVEMF 扩增组织培养系统中孵育来自正常供体的 MNC 显著增加了 CD34+细胞的数目。在独立实验中测定时，到培养的第 6 天，CD34+细胞的平均数目增加了十倍，在同一天出现平台期。

操作方法-修复心脏组织

下文描述修复人体心脏组织的说明性方案。鉴定 15 名患有重度缺血性心脏衰竭并且没有其它标准血管重建疗法可选择的患者参与此方案。患者按顺序加入，前 10 名患者指定为治疗组，后 5 名患者为对照组。所有患者在加入时均置于最高耐受度的医学治疗下。以下纳入标准是加入患者所必需的：（1）具有可通过单光子发射型计算机断层摄影术（SPECT）检测的可逆性灌注缺损（reversible perfusion defect）的慢性冠状动脉疾病；（2）左心室（LV）射血分数（EF）<40%；（3）通过冠状动脉造影评估为不适于进行经皮肤血

管重建或手术血管重建；和（4）签署知情同意书。如果符合以下排除标准中任一项，则患者不能加入本研究：（1）难以获得用于经皮肤法的血管入口；（2）瘤形成或其它可影响患者短期生存的复合病变的既往史或当前史；（3）严重的心室节律失常（持续的室性心动过速）；（4）LV 动脉瘤；（5）原因未知的异常基线实验室异常；（6）骨组织有放射学异常；（7）原发性血液疾病；（8）加入研究时三个月以内的急性心肌梗死；（9）通过 2D 多普勒超声心动图发现存在静脉血栓；（10）在进行所述方案的时间血液动力学不稳定；（11）心房颤动；或者（12）任何将患者置于过度风险的状况。

治疗组的基线评估包括完整的临床评估（病史和身体）、实验室评估（完整的血液计数、血液化学、C 反应性蛋白[CRP]、脑钠素[BNP]、肌酸激酶[CK]-MB 和肌钙蛋白血清水平）、使用斜面跑台法的运动应激测试、2D 多普勒超声心动图、双嘧达莫 SPECT 灌注扫描和 24 小时动态心电图。

对照组接受除 24 小时动态心电图、CK-MB 和肌钙蛋白血清水平之外的上述基线评估。

刚好在所述方案之前测量治疗组患者的血清 CRP、完整血液计数、CK、肌钙蛋白和 BNP 水平并进行 ECG。在所述方案之后立刻进行另一次 ECG 和 2D 多普勒超声心动图，然后开始进行 24 小时动态心电图。血清 CRP、CK 和肌钙蛋白水平也在 24 小时的时候进行评估。在进行注射方案之后监测患者 48 小时。

使用含有 5% 人血清白蛋白的肝素化盐水对例如根据实施例 1 制备的 TVEMF 扩增的血液干细胞进行彻底清洗，并通过如 100 μm 尼龙筛进行过滤以除去细胞聚集体。将所述细胞重悬在含有 5% 人血清白蛋白的盐水中，以作为药物 TVEMF 扩增血液干细胞组合物用于注射。将所述组合物的一小部分用于细胞计数和使用台盼兰排除法进行的成活力测试。细胞成活力预期为 >98%，与表 1 中所示结果相似。

观察到粒细胞-巨嗜细胞集落形成单位与 $\text{CD45}^{\text{lo}}\text{CD34}^+$ 细胞之间存在高相关性。可如前所述进行成纤维细胞集落形成测定，以确定推定的间充质祖细胞（progenitor mesenchymal）谱系的存在情况。

进行所述组合物的细菌和真菌培养以确保其为阴性。

生物素化的或者与异硫氰酸荧光素 (Pharmingen)、藻红蛋白 (PE) 或 PerCP 缀合的以下抗体是可用的: 来自 Becton Dickinson 的抗 CD45 作为灵长类白细胞标记 (克隆 HI30)、抗 CD34 作为造血祖细胞标记 (克隆 HPCA-II), 抗 CD3 作为灵长类 T 细胞标记 (克隆 SK7), 抗 CD4 作为 T 细胞亚群标记 (克隆 SK3), 以及抗 CD8 作为 T 细胞亚群标记 (克隆 SK1); 来自 Caltag Laboratories (Burlingame, Calif) 的抗 CD14 作为单核细胞标记 (克隆 TUK4), 抗 CD19 作为灵长类 B 细胞标记 (克隆 SJ25-C1), 抗 CD56 作为 NK 细胞标记 (克隆 NK1 nbl-1); 来自 Beckman-Coulter 的抗 HLA-DR (MHC-II, 克隆 B8.12.2)。生物素化的抗体可使用链霉抗生物素蛋白 PEcy7 (Caltag Laboratories) 显示。三色免疫荧光分析可用于在总的有核骨髓细胞悬液中鉴定白细胞群体。在染色之后, 将根据制造商的说明使用 Becton Dickinson 裂解缓冲液或相似溶液裂解红细胞, 并使用 CD45 抗体评估每个样品中白细胞的百分比。数据的采集和分析可在荧光激活的细胞分选器上进行, 例如带有 CellQuest 3.1 软件的 Calibur (Becton Dickinson)。

在细胞注射治疗组中, 在来自实验室的药物 TVEMF 扩增血液干细胞组合物的预计到达时间之前~1 小时将患者带至心导管术实验室。实施带有双平面 LV 血管造影的左心插管术。其后如前述实施左心房电机械标测 (electromechanical mapping, EMM)。通过与先前由 SPECT 灌注造影鉴定的缺血区域相匹配来选择大概的治疗区域。接着使用电机械标测通过鉴定该区域中有活力的心肌膜 (单极电压 ≥ 6.9 mV) 来靶向具体的治疗区域。优选与机械活动下降 (局部线性收缩 $<12\%$, 指示冬眠的心肌膜) 有关的区域。

可通过以下步骤制备 NOGA 注射导管: 将延长针调整为 0° 和 90° 的弯曲, 并将 0.1 cc 药物 TVEMF 扩增血液干细胞组合物扩增的干细胞装入针的封闭空间内。使注射导管的尖端穿过主动脉瓣并进入靶区域, 并在注射所述细胞之前仔细评估每个注射位点。在将细胞注射进 LV 壁之前, 必须符合以下标准: (1) 导管与 LV 壁垂直放置; (2) 环稳定性非常好 (<4 mm); (3) 基础电压 (underlying voltage) >6.9 mV; 和 (4) 在延长针进入心肌膜时存在室性早搏。

对治疗组中的每名患者进行 15 次注射，每次 0.2 cc，预计的细胞总数为约 1 千 4 百万个细胞/0.2 cc。优选引入的干细胞数目在本申请中有所讨论，最优选约 10^7 到 10^9 个干细胞。对照组可接受不含有任何干细胞的注射。所有患者（治疗和对照）接受 2 个月的非侵入性随访评估。

使用预计的 Vo_{2max} 调整患者的工作负荷。跑台速度最初是 0.5 mph，倾斜度为 0% 到 10%，锻炼的计划持续时间为 10 分钟。对超声心动图数据进行分析。图像可以数码形式保存并进行离线分析。根据标准操作测量收缩末期容量（ESV），舒张末期容量（EDV）和 EF。

在基线和随访中使用相同的应激方案进行双嘧达莫应激和静止 SPECT 成像。在静止和应激之后注射约 740 MBq 铈-99m sestamibi，以每分钟 142 $\mu\text{g/kg}$ 体重的速率输注双嘧达莫 4 分钟。1 个小时后开始 SPECT 成像，使用居于 140-keV 光峰中间的 15% 窗口。使用 1-检测器 γ 照相机（Ecam, Siemens）进行采集，获取 180° 上（右前斜位 45° 到左后斜位 45°）的 32 个投影（低能量，高解析度准直；64 × 64 矩阵；每个投影 35 秒）。可以使用适当的插值进行坐标转换来从重建的轴面断层照片中提取左心室的短轴以及垂直和水平长轴断层照片。不应用衰减或分散校正。定量 SPECT 分析在例如 ICON 工作站计算机（Siemens）或类似装置上进行。除了进行质控检查以证实最大计数圆周剖面以外，所述分析使用完全自动化的软件包进行。简言之，处理参数（包括顶点和最底部断层照片的短轴切片、LV 腔的中央轴和用于心肌计数搜索的限制范围）将自动产生。接着使用最大计数圆周剖面采样技术对短轴断层照片采样，对左心室体的采样使用圆柱法，对于 LV 顶点的采样使用球形法。与性别匹配的正常界限进行比较。接着产生极性图展示和定量值，以指示应激心肌灌注缺损的范围和严重程度。

对照组患者在后期的随访中不接受 NOGA 成像或重复 LV 血管造影，以避免不必要的风险。

治疗组患者将接受 4 个月的侵入性随访评估，其由 LV 血管造影和 EMM 组成。LV 血管造影可使用 5F 的猪尾导管通过股法实施。所有的血管造影图在窦性心律稳定的时期中在 2 个平面获得：30°

右前斜位视角和 60° 左前斜位视角。心室容积不在早搏期间或之后测量。使用 40 mm 球作为校准设备。

EMM 根据已建立的标准实施, 使用 15 mm 的填充阈值。在采集到点之后, 将使用一系列滤波器 (filter) (中等设置) 来进行后处理分析, 以消除内部点、不符合标准稳定性标准 (位置稳定性 <4 mm, 环稳定性 <6 mm, 循环长度变化 $<10\%$) 的点、在 ST 区段上升期间采集的点以及与左心室无关的点 (例如心房中的点)。

作图和注射的总方案时间约为 81 ± 19 分钟。电机械标测可包含平均 92 ± 16 个点。患者将在平均 2 ± 0.7 个区段 (下方 6 个、侧部 14 个、前部 2 个、间隔 5 个) 接受平均 15 ± 2 次细胞组合物注射。每次在 0.2 cc 体积中注射 1 千 4 百万个细胞。

预计所注射细胞中的 2-3% (约 $400,000/\text{mm}^2$) 是造血祖细胞 ($\text{CD45}^{\text{lo}}\text{CD34}^+$)。类似的, 预计所注射细胞中的约 0.1% (约 $15,000/\text{mm}^2$) 是早期造血祖细胞 ($\text{CD45}^{\text{lo}}\text{CD34}^+\text{HLA}^-\text{DR}^-$), 预计所注射细胞中的约 25 到 30% (约 $4,000,000/\text{mm}^2$) 是 $\text{CD4}^+\text{T}$ 细胞 ($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+$)。预计所注射细胞中的约 15% (约 $2,200,000/\text{mm}^2$) 是 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞 ($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD8}^+$), 预计所注射细胞中的约 2% (约 $1,600,000/\text{mm}^2$) 是 B 细胞 ($\text{CD45}^+\text{CD19}^+$)。预计所注射细胞中的约 10% (约 $1,400,000/\text{mm}^2$) 是单核细胞 ($\text{CD45}^+\text{CD14}^+$), 预计所注射细胞中的约 1-2% (约 $150,000/\text{mm}^2$) 是 NK 细胞 ($\text{CD45}^+\text{CD56}^+$)。

这些实验的预计结果是, 按照纽约心脏协会 (New York Heart Association, NYHA) 和加拿大心血管学会心绞痛评分 (Canadian Cardiovascular Society Angina Score, CCSAS) 的分布, 治疗组中的患者与对照组相比在 2 个月的随访期中将出现较少的心力衰竭、较少的心绞痛症状。两个组的基线锻炼测试的变量 (MET 和 Vo_2max) 相似。然而, MET 和 Vo_2max 在治疗组的随访阶段显著提高。NYHA 分级在使用 TVEMF 扩增的干细胞治疗后降低了一半, 而不使用扩增干细胞的保持不变。预计 CCSAS 也在治疗后变成治疗前的一半以下, 但是未治疗的患者基本保持不变。预计 Vo_2max 在治疗后约 35%, 而未治疗的则基本保持不变。预计超声心动图、ESV、体积在治疗后将降低约 15%, 而未治疗的将提高。预计 SPECT、总的可逆性缺

损在治疗后将降低约 80%，而未治疗的将提高。

对于 EMM，片段分析将表明进行了经注射区段显著的机械改善。将显示出注射位点机械功能的显著改善。

由此可见，通过本文讨论的治疗可实现显著的心脏修复。如果 TVEMF 扩增的干细胞是静脉内注射的，预计可达到类似的结果，尽管修复时间可能较长。

在动物模型上或其它需要心脏组织修复的情况下进行的实验预计会在组织学或病理性分析或其他所需分析中显示本发明的心脏组织修复。

操作方法-低温保存

如上文所提及的，从哺乳动物（优选人）中收集血。优选至少从血中除去红细胞。血液干细胞（及所需的其它细胞和培养基）置于 TVEMF 生物反应器中，受到随时间变化电磁力，并且扩增。如果在扩增前未除去 RBC，则优选在 TVEMF 扩增之后除去。在扩增之后，细胞可低温保存。此处提供关于低温保存 TVEMF 扩增的血液干细胞和包含这种细胞的组合物的方法的其他细节，具体见下文。

在 TVEMF 扩增之后，优选将 TVEMF 扩增的细胞（包括 TVEMF 扩增的血液干细胞）转移到至少一个含有至少一种低温保护剂的低温保存容器中。优选地，首先用溶液（例如，缓冲溶液或所期望的低温保存溶液）洗涤 TVEMF 扩增的血液干细胞，以除去培养基和 TVEMF 扩增过程中存在的其它组分，接着将其混入允许对细胞低温保存的溶液中。这种溶液一般称为低温保存剂、低温保存液或防冻剂。将所述细胞转移到合适的低温容器中，此容器一般降温至 -120°C 到 -196°C ，优选约 -130°C 到约 -150°C ，并且维持在此温度。优选在冷冻过程中缓慢且小心地降低温度，以不损伤所述干细胞或至少使损伤最小化。当需要时，将细胞的温度（即低温容器的温度）上升到与引入人体相容的温度（通常从约为室温到约为体温），然后 TVEMF 扩增的细胞被导入哺乳动物体内，优选人类，例如如上文所讨论。

冷冻细胞通常有破坏性。不限于理论地，在降温过程中，细胞内的水结冰。然后可能通过对细胞膜的渗透作用、细胞脱水、溶质

浓缩、以及冰晶形成而产生损伤。随着在细胞外部形成冰，有效水从溶液中被除去并从细胞中吸取水分，造成渗透脱水并提高溶质浓度，最终破坏细胞。（讨论参阅 Mazur, P., 1977, *Cryobiology* 14: 251-272.）

不同物质具有不同的冰点。优选地，待用于低温保存的血液干细胞组合物包含尽可能少的污染物质，以尽可能使结晶和冷冻过程中对细胞壁的损伤最小。

这些损伤作用可通过以下来降低或甚至避开：（a）应用低温保护剂，（b）控制冷冻速率，以及（c）在足够低的温度保存，以尽可能减少降解反应。

在本发明中优选包括低温保存剂。可使用的低温保护剂包括但不限于足量的二甲基亚砷（DMSO）（Lovelock, J. E. and Bishop, M. W. H., 1959, *Nature* 183:1394-1395; Ashwood-Smith, M. J., 1961, *Nature* 190:1204-1205）、甘油、聚乙烯吡咯烷酮（Rinfret, A. P., 1960, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85: 576）、聚乙二醇（Sloviter, H. A. and Ravdin, R. G., 1962, *Nature* 196: 548）、白蛋白、葡聚糖、蔗糖、乙二醇、i-赤鲜醇、D-核糖醇、D-甘露醇（Rowe, A. W., et al., 1962, *Fed. Proc.* 21:157）、D-山梨醇、i-肌醇、D-乳糖、氯化胆碱（Bender, M. A., et al., 1960, *J. Appl. Physiol.* 15:520）、氨基酸葡萄糖溶液或者氨基酸（Phan The Tran and Bender, M. A., 1960, *Exp. Cell Res.* 20:651）、甲醇、乙酰胺、单乙酸甘油酯（Lovelock, J. E., 1954, *Biochem. J.* 56:265）和无机盐（Phan The Tran and Bender, M. A., 1960, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:388; Phan The Tran and Bender, M. A., 1961 in *Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology*, Ilbery, P. L. T., ed., Butterworth, London, p.59）。在优选实施方案中使用 DMSO。DMSO 为液体，低浓度下对细胞无毒。作为小分子，DMSO 可自由穿过细胞并通过与水结合而改变其冷冻性来保护细胞内的细胞器，以及防止形成冰而造成的损害。添加血浆（即，至浓度 20-25%）可增加 DMSO 的保护效果。添加 DMSO 后，细胞应保持在 0℃或更低，因为约 1%浓度的 DMSO 在高于 4℃的温度下是有毒的。我选择的与 TVEMF 扩增的血液干细胞组合用于总组合物的优选低温保护剂为：在 60 至 80%氨基酸葡萄糖溶液中

的 20 至 40%二甲基亚砷溶液, 或者 15 至 25%的羟乙基淀粉溶液, 或者 4 至 6%的甘油、3 至 5%葡萄糖、6 至 10%葡聚糖 T10, 或者 15 至 25%聚乙二醇或者 75 至 85%氨基酸葡萄糖溶液。上文所述的低温保存剂的量优选是整个组合物中低温保存剂的总量 (不只是添加到组合物中的物质的量)。

尽管待低温保存的本发明组合物中可存在除血细胞和低温保护剂之外的其它物质, 但例如由于如上文讨论的关于冷冻机制的原因, 本发明的 TVEMF 扩增血液干细胞组合物的低温保存优选含有尽可能少的其它物质。

优选地, 将本发明的 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物冷却到温度为约-120℃到约-196℃的范围, 优选约-130℃到约-196℃, 更优选为-130℃到约-150℃。

受控的缓慢冷却速率是重要的。不同的低温保护剂(Rapatz, G, et al., 1968, Cryobiology 5(1): 18-25) 和不同的细胞类型有不同的最佳冷却速率 (对于降温速度对于外周细胞存活的影响 (以及对其移植潜力的影响) 可参阅如 Rowe, A. W. and Rinfret, A. P., 1962, Blood 20:636; Rowe, A. W., 1966, Cryobiology 3(1):12-18; Lewis, J. P., et al., 1967, Transfusion 7(1):17-32; and Mazur, P., 1970, Science 168:939-949)。水变成冰时的熔化热应该尽可能小。冷却过程可通过应用例如可编程冷冻设备或者甲醇浴方法来实施。

可编程冷冻装置允许确定最佳冷却速率并促进标准的可重现的冷却。可编程速率控制冷冻装置比如 Cryomed 或 Planar 允许将冷冻方案调整到期望的冷却速率曲线。其它可接受的冷冻装置可以是, 例如, Sanyo Model MDF-1155ATN-152C 和 Model MDF-2136 ATN-135C, Princeton CryoTech TEC 2000。例如, 对于 10% DMSO 和 20%血浆中的血细胞或者 CD34+/CD38-细胞, 最优速率为从 0℃到-200℃, 1 到 3℃/分钟。

在优选实施方案中, 此冷却速率可用于本发明所述细胞。盛有所述细胞的低温容器必须在低温下稳定, 并且允许快速的热传递, 以便于有效控制冷冻和解冻。密封塑料管 (例如 Nunc、Wheaton cryules) 或玻璃安瓿可用于多个小量 (1-2 ml), 而较大体积 (100-200

ml)可在聚烯烃袋(例如 Delmed)中冷冻,该聚烯烃袋放在金属板之间以便在冷却期间更好的传递热量。(骨髓细胞袋通过将其置于-80℃冷冻装置中成功冷冻,幸好该冷冻装置提供了约3℃/分钟的冷却速率)。

在替代实施方案中,可应用甲醇浴冷却方法。甲醇浴方法特别适合大规模的对多个小物品实施常规低温保存。该方法不需要手动控制冷冻速率也不需要记录器监测速率。在优选的方面中,DMSO处理的细胞预先在冰上冷却并转移到装满冷冻甲醇的盘中,其随后被置于-130℃机械冰箱中(例如 Harris 或 Revco)。甲醇浴和样品的热电偶检测显示期望的1到3℃/分钟的冷却速率。在至少两个小时之后,样品达到-80℃,然后可直接将其置于液氮(-196℃)中以永久保存。

完全冷冻之后,TVEMF扩增的干细胞可快速转移到长期低温保存容器中。在优选实施方案中,样品可低温保存在液氮(-196℃)中或者其蒸汽(-165℃)中。保存温度应低于-120℃,优选低于-130℃。高效液氮冰箱的可用性大大方便了这种保存,所述冰箱类似于具有极低真空和内部超绝热的大 Thermos 容器,使得热量泄漏和氮气流失都保持在绝对低值。

用于低温保存细胞的优选的装置和程序由 Thermogenesis Corp., Rancho Cordova, CA 制造,利用它们的程序将细胞温度降低到低于-130℃。在冷冻和保存期间细胞盛放于 Thermogenesis 血浆袋中。

其它冰箱是市售的。例如,“BioArchive”冰箱不但冷冻而且提供低温保存样品比如本发明的血或细胞的目录,例如同时管理高达3,626个冷冻血袋。此冰箱具有机械臂,当其在得到指示时将取出特定样品,确保不扰乱其它样品或使其暴露在较高温度中。其它市售的冰箱包含但不限于 Sanyo Model MDF-1155 ATN-152C 和 Model MDF-2136 ATN-135C,和 Princeton CryoTech TEC 2000。

在 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物的温度降低到低于-120℃之后,优选低于-130℃,它们可置于装置中,比如 Thermogenesis 冷冻装置。它们的温度保持在-120℃到-196℃,优选

-130℃到-150℃。本发明的低温保存 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物的温度不应长时间处于约-120℃。

根据本发明的低温保存的 TVEMF 扩增的血液干细胞或其组合物可冷冻无限长时间，在需要时将其解冻。例如，组合物可冷冻长达 18 年。甚至更长的时间也是可行的，可能甚至长达血供体的一生。

需要时，可将其中装有细胞的袋置于解冻系统中，比如 Thermogenesis Plasma Thawer 或 Thermoline Thawer 系列中的其它装置。低温保存的组合物的温度升至室温。在另一个优选解冻与低温保护剂混合的细胞的方法中，可将保存在液氮中的装有本发明的低温保存的 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物的袋置于液氮的气相中 15 分钟，然后暴露在室温环境空气中 5 分钟，最后在 37℃ 水浴中尽可能快的解冻。解冻的袋立刻用相同体积的溶液稀释，该溶液是含有 2.5%（重量/体积）人血清白蛋白和 5%（重量/体积）葡聚糖 40（Solplex 40; Sifra, Verona, Italy）的等渗盐溶液，接着 400 g 离心十分钟。除去上清，用新鲜白蛋白/葡聚糖溶液重悬沉降下来的细胞。可参阅 Rubinstein, P. et al., Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 10119-1012 (1995) for Removal of Hypertonic Cryoprotectant; 此优选解冻细胞方法的一种变化形式可见 Lazzari, L. et al., Evaluation of the effect of cryopreservation on ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from cord blood. *Bone Marrow Trans.* 28:693-698 (2001)。

在细胞升温到室温后，它们可用于研究或再生治疗。解冻的 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物可直接引入哺乳动物体内，优选人类，或者以其解冻形式用于期望的研究中。其中存在解冻细胞的溶液可被完全洗去，并换成或加入其他溶液或按需要进行操作。在引入哺乳动物体内之前，优选在马上将要引入之前，可将多种添加剂加入解冻组合物（或者非低温保存的 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物）中。此类添加剂包括但不限于生长因子、铜螯合剂、细胞因子、激素、适宜的缓冲剂或稀释剂。优选地，添加 G-CSF。更优选地，对于人类，以约 20 到约 40 μg/kg 体重的量添加 G-CSF，甚

至再优选地，以约 30 $\mu\text{g/kg}$ 体重的量。在引入之前，TVEMF 扩增的血液干细胞组合物可与哺乳动物自身或者合适供体的血浆、血液或白蛋白、或者其它物质（例如可伴随输血的物质）混合。解冻的血液干细胞可用于例如检验对期望用于治疗或可用于治疗的药物是否有有害反应。

尽管 FDA 尚未批准在美国将扩增的血液干细胞用于组织再生，但是这一批准看起来即将来临。直接注射足量的扩增血液干细胞应能够如本申请中所讨论的用于修复和再生心脏组织。

本发明的 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物应以足够实现组织修复或再生或者足够治疗目标疾病或病症的量引入哺乳动物体内，优选人类。优选地，将至少 20 ml 每 ml 含 10^7 到 10^9 干细胞的 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物用于任何治疗，优选一次全部使用，尤其是当发生外伤后需要立即组织修复的情况。此量对 75-80 kg 的人体是特别优选的。待引入其来源哺乳动物的组合物中的 TVEMF 扩增的血液干细胞的量部分取决于来源血物质中存在的细胞数量（特别是如果可用的数量相当有限时）。引入患者的 TVEMF 扩增的血液干细胞的优选范围可以是，比如，约 10 ml 到约 50 ml 的 TVEMF 扩增的血液干细胞组合物，其每 ml 含 10^7 到 10^9 干细胞，或者可能更多。尽管我们知道高浓度的任何物质施用给哺乳动物都可能是有毒的或者甚至是致死的，但是引入所有的哺乳动物血液干细胞，例如在 TVEMF 扩增后至少 7 倍，不可能造成 TVEMF 扩增的血液干细胞过量。在使用来自多个供体或同一供体多次收集的血的情况下，引入哺乳动物的血液干细胞的数目可以更高。同样，可引入患者的 TVEMF 细胞的剂量不受从一个个个体收集所提供的血数量的限制；多次施用可更容易应用，例如每天一次或两次，或每周一次，或其它施用时间方案。并且，在治疗组织时，所述组织类型可能准许使用尽可能多的 TVEMF 扩增的血液干细胞或使用较小的剂量。例如，与其他组织相比，肝脏可能是最易于治疗的，并且可能需要较少的干细胞。

应该理解，尽管上文所描述的实施方案通常涉及低温保存 TVEMF 扩增的血液干细胞，但是 TVEMF 扩增也可以在对已经过低温保存的、非扩增、或者非 TVEMF 扩增的血液干细胞解冻之后

进行。同时，如果期望低温保存，则可以在冷冻细胞之前或之后进行 TVEMF 扩增。例如，许多血库有低温保存的组合物，其包含处于冷冻保存状态的血液干细胞，以备在某时间点的需要。这些组合物可根据传统方法解冻，然后按照此处所述进行 TVEMF 扩增，其包括按照此处所述的 TVEMF 过程的变化形式。此后，如上文所述，此 TVEMF 扩增的血液干细胞被认为是本发明的组合物。在低温保存之前进行 TVEMF 扩增是优选的，例如假如发生外伤，已经扩增了患者的血液干细胞就不需要再花费宝贵的额外数天来准备。

同样，尽管不优选，但应注意本发明的 TVEMF 扩增的血液干细胞可低温保存，然后解冻，然后如果不使用，再低温保存。在冷冻所述细胞之前优选进行 TVEMF 扩增（即数量的增加，而不是尺寸）。所述细胞也可在冷冻接着解冻之后进行扩增，即便在冷冻之前已经进行过扩增。

血液干细胞的扩增可能需要若干天。在立刻提供血液干细胞是很重要的情况下，比如生死攸关的情况或外伤的情况，尤其在如果需要在将细胞重新引入之前完成研究的情况下，可能没有数天时间去等待血液干细胞扩增。因此，预先估计到治疗每拖延一分钟都可决定生死的紧急情况，就特别期望从出生时就有可用的扩增血液干细胞。

还应该理解，在 TVEMF 扩增后经过或不经过低温保存，本申请的 TVEMF 扩增的血液干细胞均可引入哺乳动物，优选来源哺乳动物（血来源的哺乳动物）。但是，这样的引入无需仅限于来源哺乳动物（自体）；TVEMF 扩增细胞也可转移给不同的哺乳动物（异体）。

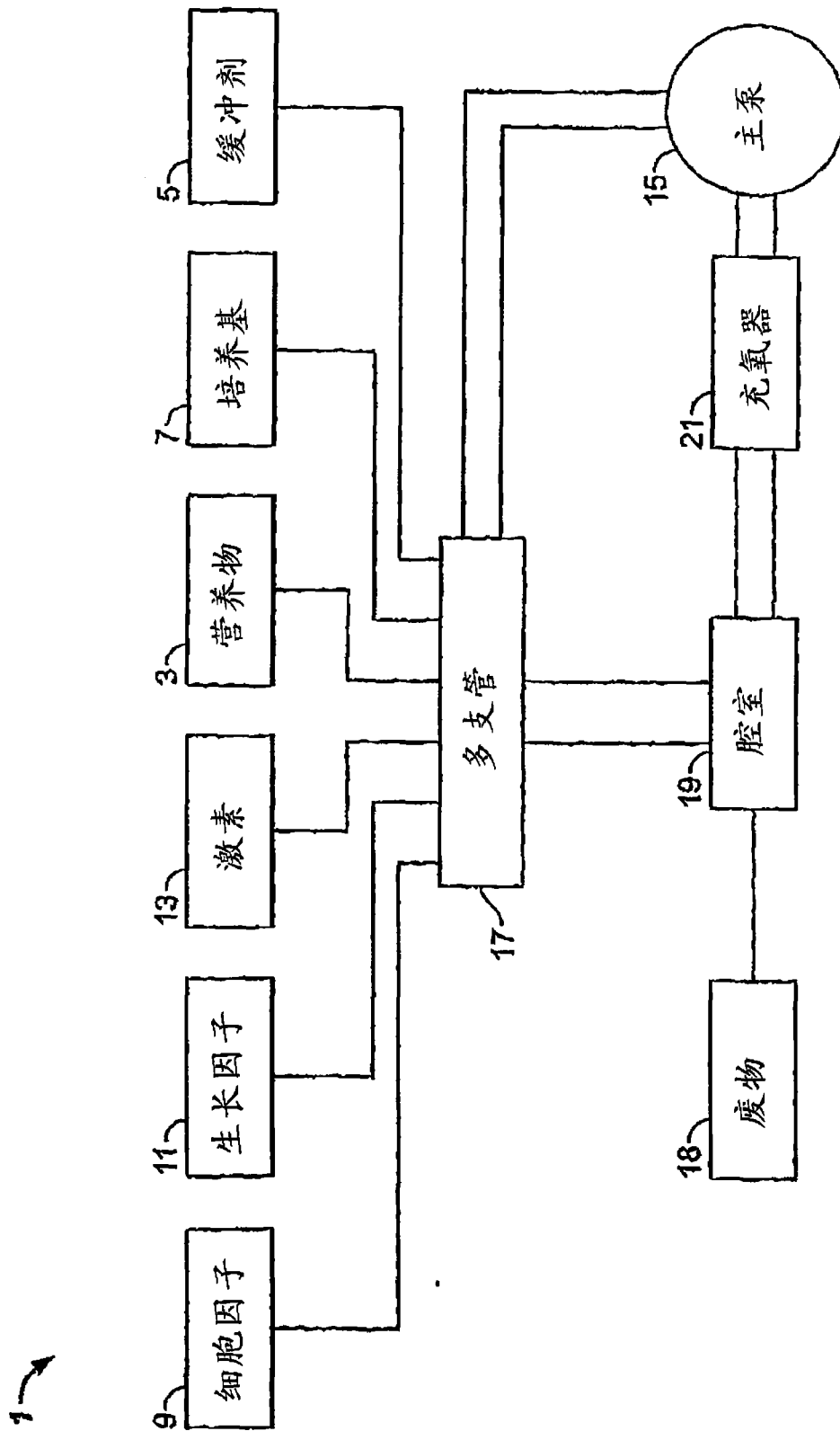
还应该理解，尽管血是本发明优选的成体干细胞来源，但来自骨髓的成体干细胞也可以与本发明血液干细胞相似的方式进行 TVEMF 扩增并使用。骨髓不是易得的干细胞来源，而是必需通过采集术（apheresis）或其它昂贵且疼痛的方法进行收集。

本发明还包括研究心脏组织（例如与心脏疾病或病症相关的）的方法。例如，所述方法可包括将 TVEMF 扩增的干细胞引入用于此疾病状态的测试系统。这样的系统可包括但不限于例如患有此疾

病的哺乳动物、用于研究所述疾病的适当动物模型或用于研究所述疾病的体外测试系统。如本领域技术人员所公知，TVEMF 扩增血液干细胞可用于研究心脏相关疾病可能的治疗方法。

在扩增、保存、和解冻的完整过程中，本发明的血液干细胞均维持其三维几何结构及其细胞-细胞支持以及细胞-细胞几何结构。

尽管本文描述了优选的实施方案，本领域技术人员会理解本发明包括了多种变化与改良。本发明的范围不限于上文所描述的实施方案。



一
四

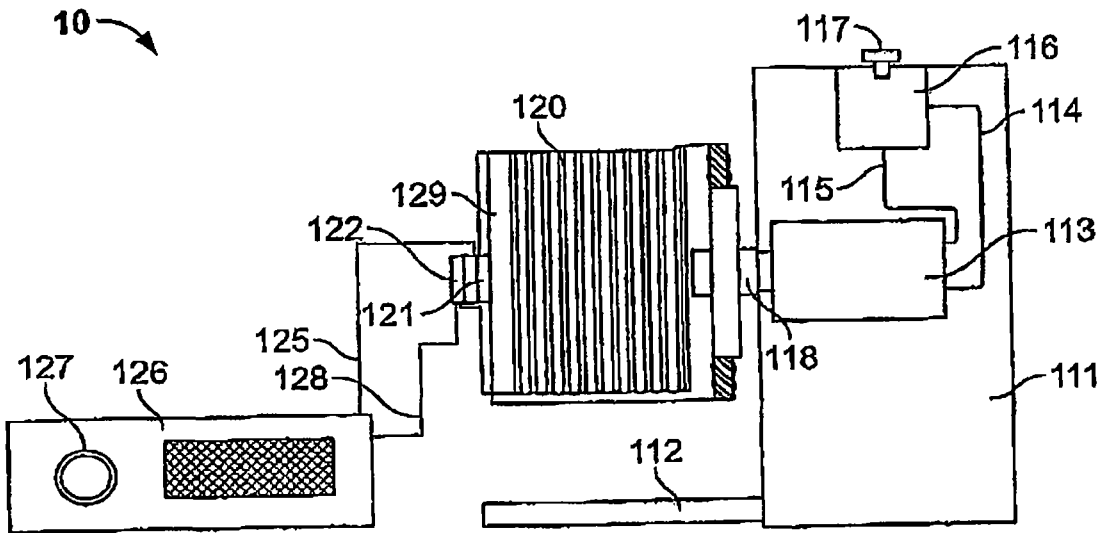


图 2

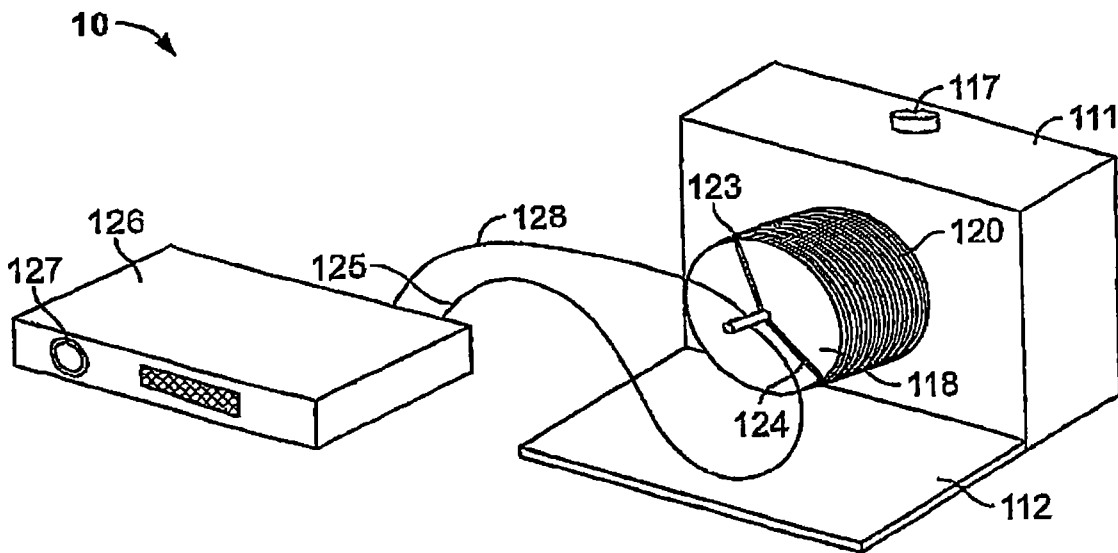


图 3

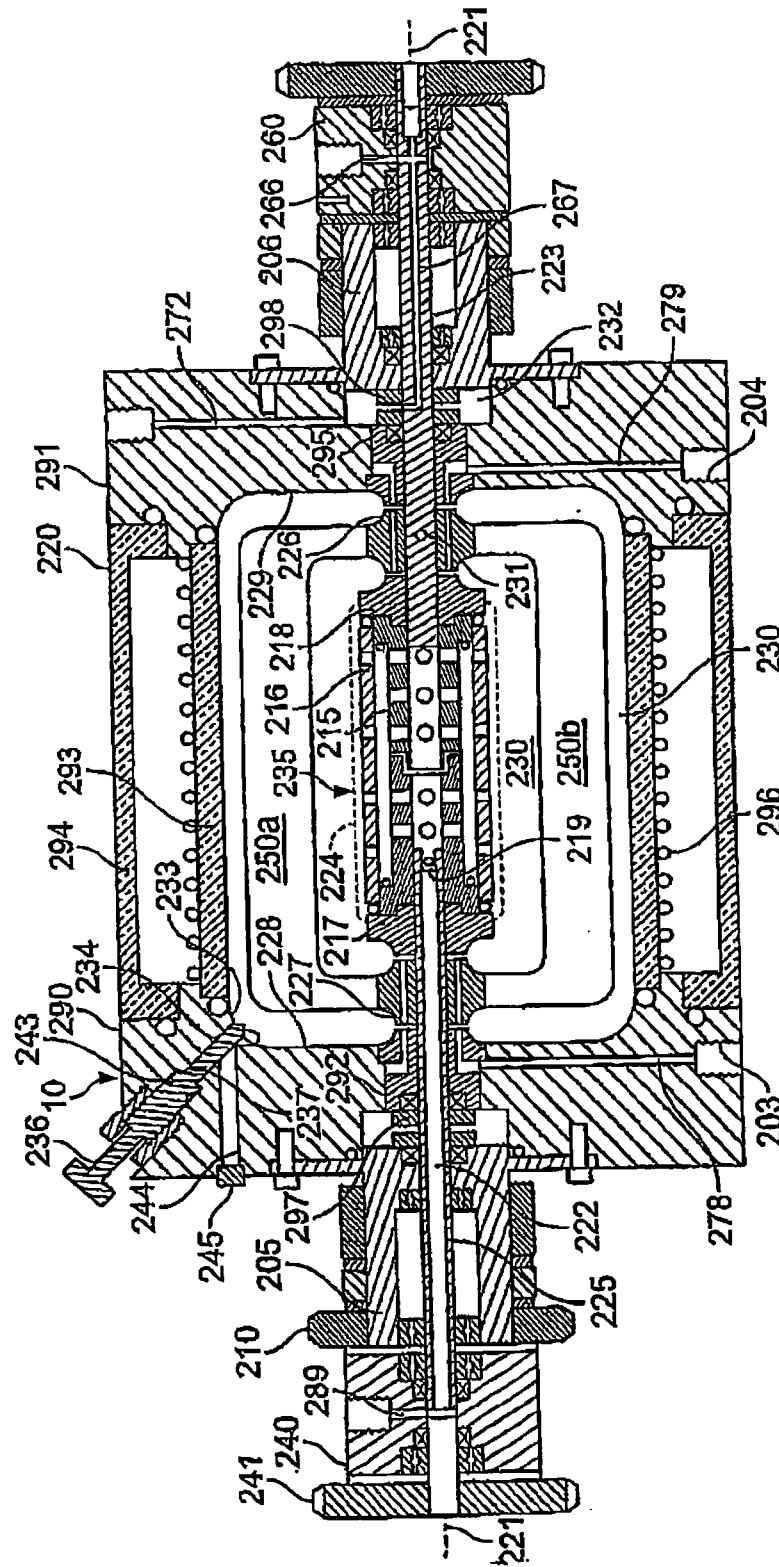


图 4

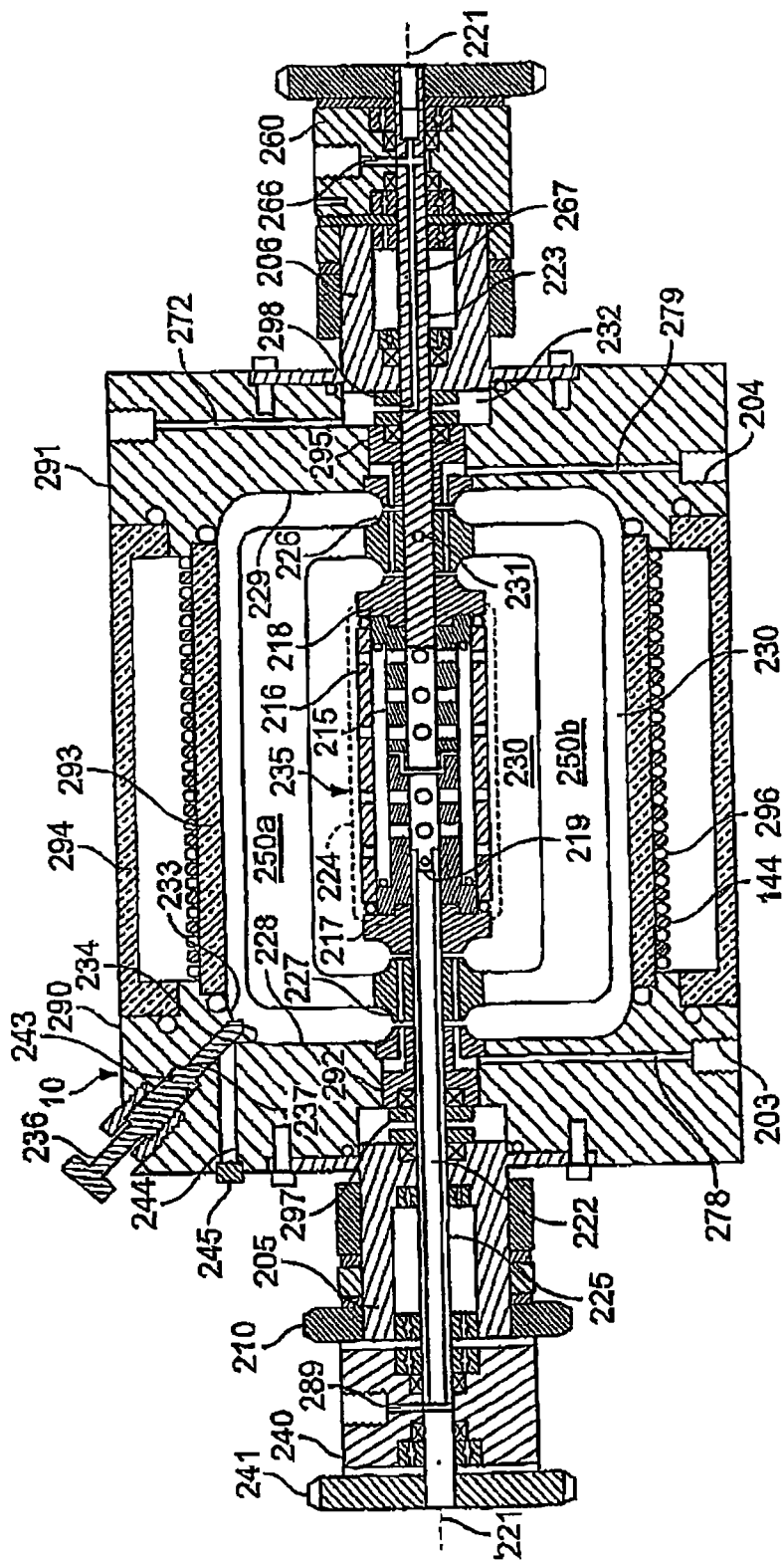


图 5

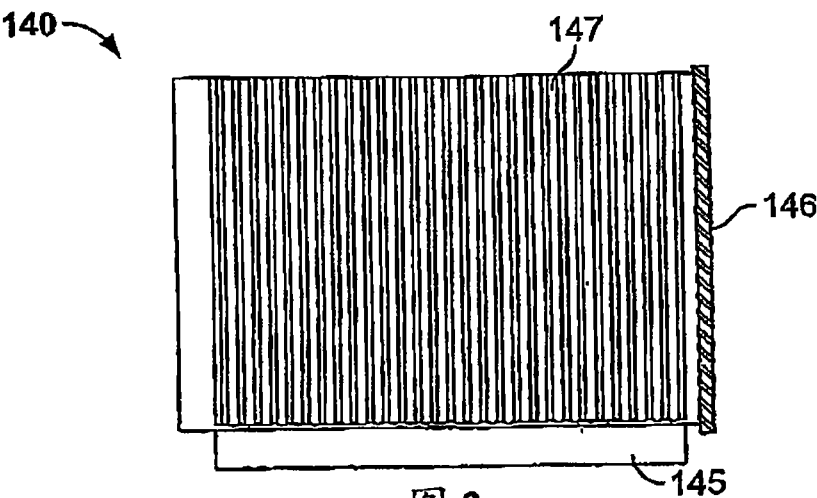


图 6

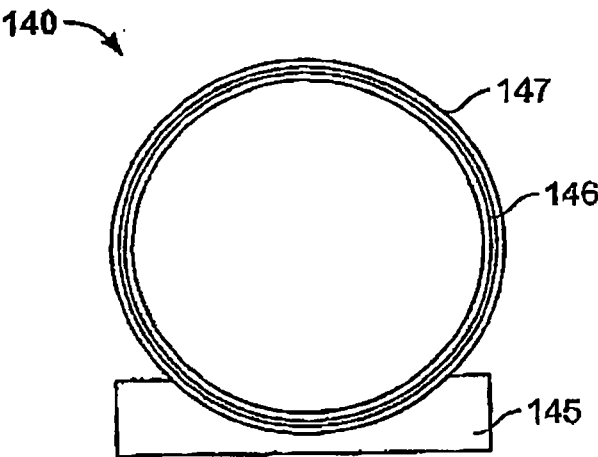


图 7

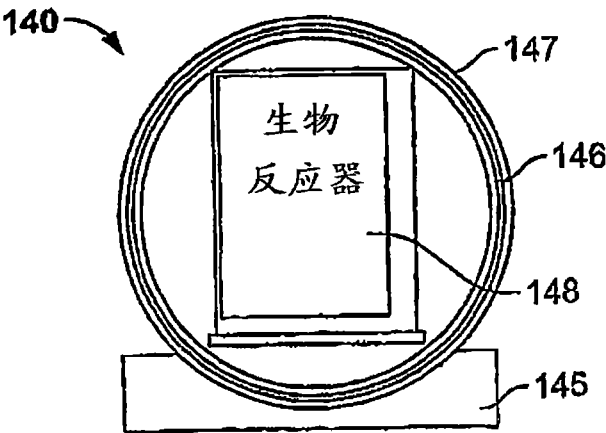


图 8