



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102762720 B

(45) 授权公告日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201080059186. 8

(22) 申请日 2010. 11. 11

(30) 优先权数据

61/260, 607 2009. 11. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 06. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/056340 2010. 11. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/060135 EN 2011. 05. 19

(73) 专利权人 VBI 技术有限责任公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·P·瓦森提 C·A·瓦森提

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 丁香兰 韩蕾

(51) Int. Cl.

C12N 5/0789(2006. 01)

C12N 5/00(2006. 01)

C12N 5/0775(2006. 01)

C12N 5/077(2006. 01)

C12N 5/071(2006. 01)

C12N 5/0797(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 01/49113 A1, 2001. 07. 12, 实施例 1-16.

US 2004/0033598 A1, 2004. 02. 19, 全文.

US 2004/0057942 A1, 2004. 03. 25, 实施例

1-12、附图以及说明书第 0008 段和第 0053 段.

US 2009/0275067 A1, 2009. 11. 05, 全文.

US 7060492 B2, 2006. 06. 13, 全文.

US 7560275 B2, 2009. 07. 14, 全文.

US 7575921 B2, 2009. 08. 18, 全文.

Martin P. Vacanti et al.. Identification and Initial Characterization of Spore-Like Cells in Adult Mammals.《Journal of Cellular Biochemistry》.2000, 第 80 卷(第 3 期), 摘要以及附图 1.

审查员 赵鹏

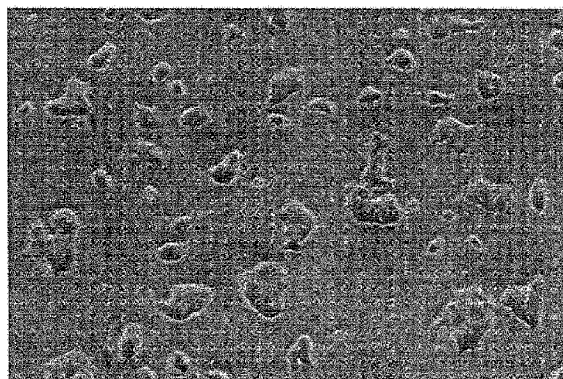
权利要求书1页 说明书15页 附图1页

(54) 发明名称

类孢子细胞子群及其用途

(57) 摘要

本发明提供表达特定细胞表面和基因表达标记物的类孢子细胞子群。在一个实施例中,所述细胞表达选自由以下各物组成的群组的至少一种细胞表面或基因表达标记物:Oct4、nanog、Zfp296、cripto、Gdf3、Utf1、Ecat1、Esg1、Sox2、Pax6、巢蛋白、SCA-1、CD29、CD34、CD90、B1 整合素、cKit、SP-C、CC10、SF1、DAX1 和 SCG10。本发明还提供从类孢子细胞群中纯化出相关类孢子细胞子群的方法,以及诱导类孢子细胞分化成内胚层、中胚层或外胚层来源的细胞的方法。所述类孢子细胞可用于产生源自于全部三种胚层的细胞,并且可用于治疗在包括视网膜、肠、膀胱、肾脏、肝脏、肺、神经系统或内分泌系统在内的多种组织中的任一种中具有功能细胞缺陷的患者。



1. 一种分离的类孢子细胞子群,其表达一种或一种以上选自由以下各物组成的群组的标记物:Oct4、nanog、Zfp296、cripto、Gdf3、Utf1、Ecat1、Esg1、Sox2、Pax6、SCA-1、CD29、CD34、CD90、B1 整合素、cKit、SP-C、CC10、SF1 和 SCG10,其中所述细胞在缺氧最少 24 小时后仍可存活。

2. 根据权利要求 1 所述的类孢子细胞子群,其中,所述细胞是从选自由外胚层、中胚层和内胚层组织组成的群组的出生后动物组织分离。

3. 根据权利要求 2 所述的类孢子细胞子群,其中,所述出生后动物组织选自由哺乳动物、禽类、爬行动物和两栖动物组织组成的群组。

4. 根据权利要求 3 所述的类孢子细胞子群,其中,所述组织选自由心脏、肠、膀胱、肾脏、肝脏、肺、肾上腺、皮肤、视网膜和胰脏组成的群组。

5. 根据权利要求 1 所述的类孢子细胞子群,其中,所述细胞进一步表达巢蛋白。

6. 一种分离类孢子细胞子群的方法,其包含以下步骤:

(a) 从组织分离类孢子细胞,

(b) 培养所述细胞一段足以表达一种或一种以上选自由以下各物组成的群组的标记物的时间:Oct4、nanog、Zfp296、cripto、Gdf3、Utf1、Ecat1、Esg1、Sox2、Pax6、SCA-1、CD29、CD34、CD90、B1 整合素、cKit、SP-C、CC10、SF1 和 SCG10,以及

(c) 鉴别并分离表达所述一种或一种以上标记物的细胞,其中所述细胞在缺氧最少 24 小时后仍可存活。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中,所述细胞是使用所述标记物特异性抗体分离。

8. 根据权利要求 6 所述的方法,其中,所述步骤 (c) 包含:使所述细胞与标记物特异性结合搭配物在足以使所述结合搭配物与其在所述类孢子细胞群每一细胞上可能存在的目标结合的条件下接触,其中所述标记物选自由以下各物组成的群组:Oct4、nanog、Zfp296、cripto、Gdf3、Utf1、Ecat1、Esg1、Sox2、Pax6、SCA-1、CD29、CD34、CD90、B1 整合素、cKit、SP-C、CC10、SF1 和 SCG10;和

分离所述标记物阳性细胞以产生类孢子细胞子群。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述细胞是使用荧光活化细胞分选法分离。

10. 根据权利要求 8 所述的方法,进一步包含使所述细胞与巢蛋白特异性结合搭配物接触。

类孢子细胞子群及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及类孢子细胞子群的鉴别、分离和使用。

背景技术

[0002] 多能细胞的使用已经在医药研究领域,尤其是提供用于治疗因遗传缺陷、损伤和/或疾病过程引起的组织损伤的试剂领域引起人们的关注。理想情况是,可将能够分化成受影响细胞类型的细胞移植到有需要的个体中,在个体体内,这些细胞将与器官微环境相互作用,并提供必要的细胞类型来修复损伤。胚胎干 (Embryonic stem, ES) 细胞是来源于胚泡的多能细胞,其可在体外以未分化状态无限增殖,可在体内分化成所有细胞谱系,并且可在体外经过诱导而分化成大多数细胞类型 (马丁 (Martin), 美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA.), 78:7634-7638(1981))。尽管已经从人类中分离出 ES 细胞,但其在研究以及治疗学中的应用因伦理方面的约因而受到阻碍 (弗兰克 (Frankel), 科学 (Science), 287:1397(2000))。

[0003] 已经不断地尝试从包括造血细胞 (美国专利第 5,750,397 号)、神经细胞 (盖吉 (Gage), 科学, 287:1433-1438(2000))、胃肠细胞 (普腾 (Potten), 伦敦皇家学会哲学汇刊 B 辑:生物科学 (Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.) 353:821-830(1998))、表皮细胞 (瓦特 (Watt), 伦敦皇家学会哲学汇刊 B 辑:生物科学, 353:831-837(1998)) 和间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) (美国专利第 5,736,396 号) 在内的非胚胎组织分离干细胞。也已经从骨髓中纯化出另一细胞群,即专能成体祖细胞 (multipotent adult progenitor cell, MAPC) (雷耶斯 (Reyes) 等人, 血液学 (Blood), 98(9):2615-2625(2001); 雷耶斯和维特法雷 (Vetfaillie), 纽约科学院年报 (Ann NY Acad Sci), 938:231-235(2001))。这些细胞能够在体外扩增以实现超过 100 代群体倍增,同时无端粒缩短或不会发生核型异常。经显示,MAPC 也能在指定培养条件下分化成各种间充质细胞类型 (例如成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞和骨骼肌成肌细胞)、内皮、神经外胚层细胞,且更近来显示其分化成肝细胞 (斯查沃兹 (Schwartz) 等人, 临床研究 (Clin Invest), 109:1291-1302(2000))。

[0004] 使用 ES 细胞或其它多能细胞用于个体的再生疗法的一个问题是控制这些细胞的生长和这些细胞成为个体治疗所需的特定细胞类型的分化。如斯查丁纳 (Schuldiner) 等人, 美国国家科学院院刊, 97:11307-11312(2000) 中所揭露,其中所用八种生长因子都不能仅定向分化成一种细胞类型。因此,仍需要用于产生适于多种应用 (包括治疗各种器官和/或组织的损伤和/或疾病) 的可移植专能和多能细胞群的新方法。此外,专能或多能细胞的来源因这些细胞必须从活体组织采集而受到限制。

[0005] 瓦坎提 (Vacanti) 等人的美国公开申请案第 2004/0057942 号和第 2004/0033598 号揭露了对缺氧具有特别高耐受性的小原始细胞。经证实,这些称为“类孢子”细胞的细胞可基本上耐受完全缺氧环境至少 24 小时 (尽管缺氧 4 小时或 24 小时,细胞仍可存活)。类孢子细胞的增殖能力比从特化组织分离的终末分化细胞强。增殖能力是一种重要的特性,

因为组织工程、细胞疗法和基于基因的疗法常常会因医师无法获得足够数量的细胞授予患者而受阻。

[0006] 因此,本发明一个目的是提供表达特定细胞表面或基因表达标记物的类孢子细胞子群。

[0007] 本发明另一目的是提供多能类孢子细胞子群,以及分离多能类孢子细胞子群的方法。

发明内容

[0008] 已经鉴别出表达特定细胞表面受体和 / 或基因表达标记物的类孢子细胞子群。在一个实施例中,所述细胞表达至少一种细胞表面 / 基因表达标记物,例如 Oct4、nanog、Zfp296、cripto、Gdf3、Utf1、Ecat1、Esg1、Sox2、Pax6、巢蛋白、SCA-1、CD29、CD34、CD90、B1 整合素、cKit、SP-C、CC10、SF1、DAX1 和 SCG10。在大多数实施例中,所述细胞表达标记物组合。本发明还提供可经过诱导而分化成内胚层、中胚层或外胚层来源的细胞的类孢子细胞子群。这些类孢子细胞子群不管来源的组织如何,都可用于产生来源于全部三种胚层的细胞。

[0009] 本发明描述用于鉴别和获得类孢子细胞子群的方法。所述方法包括培养分离的类孢子细胞一段足以表达细胞表面和 / 或基因表达标记物的时间,以及鉴别这些细胞表面和 / 或基因表达标记物。

[0010] 还描述用于从类孢子细胞群中纯化出相关类孢子细胞子群的方法。在一些实施例中,所述方法包括 (a) 提供类孢子细胞群;(b) 鉴别表达例如 Oct4、nanog、Zfp296、cripto、Gdf3、Utf1、Ecat1、Esg1、Sox2、Pax6、巢蛋白、SCA-1、CD29、CD34、CD90、B1 整合素、cKit、SP-C、CC10、SF1、DAX1 和 / 或 SCG10 等一种或一种以上标记物的类孢子细胞子群;和 (c) 纯化所述子群。在一些实施例中,使用细胞表面标记物特异性抗体分离所述细胞。

[0011] 患有病症(例如皮肤病)、肿瘤或疾病(例如糖尿病)的患者可例如通过将类孢子细胞子群授予损伤区域(例如患者皮肤的损伤区域、切除肿瘤的区域或胰脏)来进行治疗。全身投药也是可能的。所述方法可用于治疗在例如视网膜、肠、膀胱、肾脏、肝脏、肺、神经系统(包括脊髓或脑)或内分泌系统等多种组织中的任一种中具有功能细胞缺陷或病症的患者。

附图说明

[0012] 图 1 显示从胰岛瘤(胰脏肿瘤)分离的类孢子细胞。

具体实施方式

[0013] I. 定义

[0014] 如本文中所用,多能类孢子细胞是一种能够产生来源于全部三种胚层(中胚层、内胚层和外胚层)的细胞的类孢子细胞。

[0015] 如在类孢子细胞的上下文中使用的术语“分离的”表示这种细胞与其天然环境分开。分离的细胞可完全与其它细胞类型分离,或者可在群体中以较多量存在。

[0016] 如本文中所用,富集类孢子细胞的群体是这样一种细胞群,其已经与在其天然环

境中存在的其它细胞分离,以致细胞混合物中这种细胞的比例高于在其天然环境中所发现或刚分离后的比例。

[0017] 如本文中所用,“可检测标记”是指可添加到相关结合搭配物以允许检测所述结合搭配物的任何部分。

[0018] II. 类孢子细胞群

[0019] 类孢子细胞的来源

[0020] 类孢子细胞可从例如禽类、爬行动物、两栖动物或哺乳动物等动物供体获得。举例来说,可从啮齿动物、兔、母牛、猪、马、山羊、绵羊、狗、猫、非人类灵长类动物或人类分离出哺乳动物类孢子细胞。类孢子细胞可从成熟动物获得。由于类孢子细胞对于缺氧的耐受性优于分化的细胞,故也可从死亡的动物(包括已经死亡达 24 小时或更长时间的动物)分离有活力的类孢子细胞。类孢子细胞是从在食品杂货店购买的鸡肝(禽类)分离。初始分离时,台盼蓝染料排除测试(trypan blue dye exclusion test)显示有活力的(染料排除的)类孢子细胞极少。分离后三天,可以看到大的漂浮的类孢子细胞团,数量太多无法计数(数据未显示)。

[0021] 在给定的供体内,类孢子细胞可从多种来源获得。举例来说,可从体液(例如血液、唾液或尿液)和大多数(如果不是全部的话)功能器官获得类孢子细胞。此外,还可从随后将用类孢子细胞治疗的患者、从另一个人或从不同物种的动物获得类孢子细胞。可获得自体、同种异体和异种类孢子细胞子群并用于治疗患者或生长组织。

[0022] 类孢子细胞也可从患病组织(例如癌组织)分离得到(图 1)。由此分离的类孢子细胞在适当条件下具有显著的再生潜力。

[0023] 类孢子细胞的分离

[0024] 用于分离类孢子细胞的方法揭露于颁予瓦坎提等人的美国专利第 7,060,492 号、第 7,575,921 号和第 7,560,275 号中。简单点说,从动物获得组织或血液样品。最易于获得的一种样品是全血样品。所属领域技术人员应理解,分离方法可根据用作原材料的组织类型而略有变化。举例来说,在样品是血液样品的情况下,其可被放入含有抗凝血剂的管中。

[0025] 收集后,组织样品,无论其是体液样品还是从实体器官获得的细胞悬浮液样品,都以足以使样品内的细胞在离心管底部聚结成球的时间和速度离心。所得细胞小球再悬浮于补充有葡萄糖、转铁蛋白(transferrin)、胰岛素、腐胺(putricine)、硒、孕酮、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的适合培养基(例如 DMEM/F-12 培养基)中。

[0026] 随后将悬浮的细胞转移到组织培养容器中,并在 37°C 或接近 37°C 下培育。起初,当样品是血液样品时,培养烧瓶主要含有造血细胞。然而,在培养数天后,红细胞溶解,以致培养物主要(如果不是全部的话)含有类孢子细胞。这是因为红细胞没有细胞核;而类孢子细胞在这些条件下仍能存活。当从实体组织分离类孢子细胞时,可通过用一系列移液管(各自具有比前一个小的孔径)湿磨样品,来溶解分化细胞。举例来说,所用最后一个移液管可具有约 15 μ 的孔径。再培养数天后,类孢子细胞倍增,并且可连合形成细胞团(球)。经过一段时间(通常约 7 天),其数量可大幅增加。通常,当如上文所述进行分离时,根据台盼蓝排除研究,超过 90% 的细胞存活。

[0027] 所属领域技术人员将认识到,经由减小孔的移液管进行湿磨不是从较大的分化细

胞分离类孢子细胞的唯一方式。举例来说,可使含有类孢子细胞和分化细胞的悬浮液通过具有特定尺寸的孔的过滤器。过滤器内孔隙的尺寸(以及类似地用于湿磨的移液管的直径)可根据希望的分离程序严格度而变化。一般说来,过滤器内的孔隙越小,或用于湿磨的移液管直径越小,则将从分离程序存活的分化细胞的数量越少。用于分离类孢子细胞的其它方法是冷冻/解冻和尺寸排阻法。

[0028] 在一些实施例中,用于从血液/骨髓分离类孢子细胞,同时确保排除细胞/干细胞类型的方法包括:在不添加任何冷冻保护剂情况下,将经过抗凝血处理的全血冷冻到 -20°C 到 -80°C ,随后将冷冻的样品解冻。在冷冻期间形成的细胞内冰晶将杀死所有其它细胞。随后在培养基中湿磨细胞,接着培养。剩余的生长细胞是类孢子细胞。从血液分离类孢子细胞的其它技术包括缺氧 24 小时。用高渗溶液溶解血液或骨髓样品以使细胞/干细胞破裂。在培养物中不使用血清和喂养细胞来选择类孢子细胞。这些方法特别适用于血液以及其它组织。

[0029] 类孢子细胞子群的富集

[0030] 本发明揭露一种用于富集和表征、鉴别或分析富集类孢子细胞的子群的方法。所述富集子群是使用由所述细胞表达的细胞表面或基因表达标记物鉴别。如实例中所说明,将细胞培养一段足以表达特定标记物的时间,并使用所属领域技术人员已知的技术确定标记物的表达。富集类孢子细胞的群体对例如 Oct4、nanog、Zfp296、cripto、Gdf3、UtF1、Ecat1、Esg1、Sox2、Pax6、巢蛋白、SCA-1、CD29、CD34、CD90、B1 整合素、cKit、SP-C、CC10、SF1、DAX1 和 SCG10 等一种或一种以上特定细胞标记物呈阳性。在检测相关标记物之后可使用富集类孢子细胞的群体,这些细胞可进一步培养以促进额外分化,或可从富集的子群进一步分离表达所述标记物的细胞。

[0031] 所属领域技术人员已知用于分离表达相关蛋白质的细胞供进一步增殖的方法。举例来说,可使用美国专利第 7,310,147 号中揭露的通过使上千个细胞成像来运作的市售 ClonePix FL 系统(英国 Gentix 公司)分离表达相关标记物的细胞。随后使用特定荧光探针来检测和鉴别发荧光的集落。然后,自动收集具有所需荧光度水平的细胞(例如目标蛋白质的最高制造者)(曼恩(Mann),自然方法(Nature Methods),i-ii,(2007))。这些细胞的球形团连续传代产生较纯的不成熟且更原始的干细胞群。在其它实施例中,使用细胞表面或基因表达标记物分离相关类孢子细胞子群。在关于细胞表面标记物的一个实施例中,所述方法包括(a)提供如上文所述分离的类孢子细胞群;(b)培养所述类孢子细胞群一段足以表达所述标记物的时间;(c)使所述细胞群与标记物特异性结合搭配物在足以使结合搭配物与其在所述类孢子细胞群每一细胞上可能存在的目标结合的条件下接触;和(d)分离标记物阳性子群。

[0032] 在一些实施例中,在上文论述的步骤(c)中,在足以使每一结合搭配物与其在类孢子细胞群每一细胞上可能存在的目标结合的条件下,细胞与第一标记物特异性第一结合搭配物以及第二标记物(不同于第一标记物)特异性第二结合搭配物接触;(d)选择对标记物呈阳性的第一类孢子细胞子群;(e)使第一类孢子细胞子群与对一种或一种以上其它细胞表面标记物具特异性的一种或一种以上其它结合搭配物在足以使每一结合搭配物与其在细胞群每一细胞上可能存在的目标结合的条件下接触;(f)从第一细胞子群取出结合于步骤(e)的至少一种抗体的细胞;和(g)收集第二细胞子群,由此分离类孢子细胞子群。

在一些实施例中,结合搭配物是细胞表面标记物特异性抗体。

[0033] 所揭露的子群的分离可使用能根据一种或一种以上特定标记物的表达或表达的缺乏而分离细胞的任何方法(包括但不限于)荧光活化细胞分选法(fluorescence-activated cell sorting, FACS))进行。标记物选自以下各物组成的群组: Oct4、nanog、Zfp296、cripto、Gdf3、Utf1、Eca1、Esg1、Sox2、Pax6、巢蛋白、SCA-1、CD29、CD34、CD90、B1 整合素、cKit、SP-C、CC10、SF1、DAX1、SCG 10、SCA-1、CD34、CD90、CKIT、B1 整合素。

[0034] 分离步骤可按一系列步骤逐步或同时进行。举例来说,可个别地评估每一标记物的存在或不存在,根据个别标记物的存在与否,在每一步骤产生两个子群。之后,可选出相关子群,并根据下一标记物的存在或不存在再分。

[0035] 或者,可通过只分出具有特定标记物概况(marker profile)的细胞来产生子群,其中短语“标记物概况”是指关于两种或两种以上标记物存在或不存在的概要。这些个别标记物组合中每一者都表示一种不同的标记物概况。当添加其它标记物时,这些概况会变得更复杂,并对应于越来越小的初始混合的细胞群的百分含量。在一些实施例中,采用标记物特异性抗体来分离和/或纯化具有相关标记物概况的类孢子细胞子群,并且应了解,根据相关标记物概况,可使用这些抗体阳性或阴性选择某一群体的数个部分,这些部分在一些实施例中接着再分成数部分。

[0036] 在一些实施例中,结合搭配物标记有可检测标记。结合不同标记物的不同结合搭配物可标记有不同可检测标记,或者可采用相同可检测标记。所属领域技术人员已知多种可检测标记,以及用于将可检测标记与例如抗体和其片段和/或衍生物等生物分子偶联的方法。代表性可检测部分包括(但不限于)共价连接的发色团、荧光部分、酶、抗原、具有特异性反应性的基团、化学发光部分和可以电化学方式检测的部分等。在一些实施例中,结合搭配物经生物素化。在一些实施例中,使用包含与荧光标记(包括但不限于)Cy3、Cy5 和 Cy7)偶联的抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素基团的第二结合搭配物来检测结合细胞表面上的标记物的生物素化结合搭配物(第一结合搭配物)。在一些实施例中,结合搭配物用例如 Cy3、Cy5 或 Cy7 等荧光标记直接标记。在一些实施例中,结合搭配物用荧光标记直接标记,且结合抗体的细胞借助荧光活化细胞分选法分离。所属领域技术人员已知其它检测策略。

[0037] III. 类孢子细胞子群的应用

[0038] 细胞培养和遗传操作

[0039] 本文中揭露的细胞可直接投予患者;在投予前经过诱导而分化成内胚层、外胚层或中胚层中任一来源的细胞;或者可遵循遗传操作使其表达特定因子。举例来说,可通过用包括编码这些因子的序列的基因构筑体转染类孢子细胞子群,来使其表达激素,例如胰岛素。

[0040] 类孢子细胞子群的分化

[0041] 类孢子细胞子群不管其来源组织如何都可经过诱导而分化成来自三种胚层中任一种的细胞,例如皮肤和毛发细胞,包括上皮细胞、角化细胞、黑素细胞、脂肪细胞;形成骨骼、肌肉和结缔组织的细胞,例如肌细胞、软骨细胞、骨细胞、肺泡细胞;实质细胞,例如肝细胞、肾细胞、肾上腺细胞和胰岛细胞(例如 α 细胞、 δ 细胞、PP 细胞和 β 细胞);血液细胞

(例如白细胞、红细胞、巨噬细胞和淋巴细胞);视网膜细胞(和感官知觉中所涉及的其它细胞,例如形成耳中的毛细胞或舌上的味蕾的细胞);神经组织,包括脑和神经;和成纤维细胞。

[0042] 类孢子细胞子群可经过诱导而以多种方式分化。标记物阳性类孢子细胞当与患者体内的组织接触或与将受组织释放的物质(例如生长因子、酶或激素)影响的所述组织足够接近时可发生分化。细胞分化受细胞从周围组织接收到的信号影响。举例来说,当细胞表面上的受体结合并转导来自患者体内组织所释放的分子(例如生长因子、酶或激素)的信号时,将发生此信号传导。或者,或另外,可通过将某种物质(例如生长因子、酶、激素或其它信号传导分子)添加到细胞环境中,来诱导本文中揭露的细胞分化。举例来说,可将某种物质添加到含有类孢子细胞子群的培养皿中、添加到适于将细胞施用于组织的网格或其它衬底,或添加到患者体内的组织中。当全身或局部授予诱导细胞分化的物质时,其可根据药理学上可接受的方法授予。举例来说,可在载剂或赋形剂存在或不存在下,以生理学相容的缓冲液授予蛋白质、多肽或寡核苷酸。因此,类孢子细胞子群可在培养物中或在患者体内分化,并且可在与固体支撑物接触或暴露于自然表达、外源授予或因遗传操作而表达的物质后进行分化。

[0043] 在一个实施例中,通过将类孢子细胞群暴露于“外胚层分化”培养基来诱导所述细胞分化成外胚层来源的细胞。在另一实施例中,通过将类孢子细胞群暴露于“中胚层分化培养基”来诱导所述细胞分化成中胚层来源的细胞。在又一实施例中,通过将类孢子细胞群暴露于“内胚层培养基”来诱导所述细胞分化成内胚层来源的细胞。所属领域技术人员已知“内胚层”、“中胚层”和“外胚层”培养基的组分。可使用已知的细胞表面标记物来验证细胞确实分化成相应细胞培养基谱系的细胞。最普遍认可的用以确定三种胚层分化的标记物是 α 胎蛋白(对于内胚层细胞)、 α 平滑肌肌动蛋白(对于中胚层)和 β -III 微管蛋白(对于外胚层)的表达,所有这些蛋白质通常都是在这些组织发育的最早期表达。

[0044] 不管分化的刺激物如何,足以帮助维持或修复组织的已经分化或将要分化的类孢子细胞子群都可授予患者(例如,皮肤烧伤或其它受外伤区域、骨折、韧带撕裂、萎缩的肌肉、功能失常的腺体或受神经退化过程或自体免疫反应不良影响的区域的部位)。

[0045] 肿瘤类孢子细胞

[0046] (i) 疫苗治疗

[0047] 获得的类孢子细胞子群可为特别有用的研究工具,并且有可能用于疗法中,例如,从胰脏肿瘤分离的类孢子细胞可与树突状抗原呈递细胞一起使用,作为连续细胞介导的疫苗。

[0048] 目前的实验性树突状细胞疫苗使用了很短的一段时间,但最终失败了,很可能是因为这些疫苗是源自于成熟肿瘤细胞。如果肿瘤细胞的遗传学发生改变,那么疫苗可能会变得无用,类似于每年的病毒流感疫苗所出现的情形。获得有力进化的肿瘤干细胞应能制造出更有效的疫苗。可培养肿瘤源性类孢子细胞群并用于刺激免疫系统细胞攻击并潜在地治疗肿瘤或恶性疾病,如例如廖(Liau)等人,神经肿瘤学杂志(J. of Neuro.) 90(6): 1115-24(1999)中所证实。廖等人(1999)证实,可通过实际地分离特定类型脑肿瘤(颅内胶质瘤)的细胞,并刺激可源自于患者的称为树突状细胞的特定类型免疫细胞,所述免疫细胞接着实际地处理由肿瘤细胞产生的抗原,并由此刺激免疫系统其余部分攻击实际脑肿

瘤,引起肿瘤消退或消失,以此治疗脑肿瘤。此攻击是通过由例如 T-8、T-4 以及 B 细胞和自然杀伤细胞等免疫细胞产生的细胞因子的产生来介导。这一特殊方法已经在治疗脑肿瘤的动物和早期人类试验中显示出治疗益处。这种技术的一个主要局限性在于,尽管能制造出针对特定类型肿瘤细胞的有效疫苗,但随时间推移,肿瘤发生突变,并因此可能产生不会对初始疫苗具反应性的新肿瘤。因此,可使用将表达更多种抗原并能持续保持在培养状态的肿瘤源性类孢子细胞代替肿瘤细胞。由于这些类孢子细胞表达抗原并发生突变,故可以合成最新的疫苗,并用于治疗患者的肿瘤复发。人们已经注意到,在称为胰岛瘤的特定类型肿瘤中存在类孢子细胞。没有理由预期无法从所有肿瘤类型分离出类孢子细胞。使用肿瘤源性类孢子细胞刺激疫苗的一个潜在优势在于这样一个事实:因为类孢子细胞非常原始,所以其具有充分的潜力来表达并分化成多种肿瘤细胞,且表达多种抗原。换句话说,如果使用较为基础的肿瘤细胞来制造疫苗,那么针对具有较大潜力产生不同类型肿瘤抗原的细胞的免疫反应的多样性将会因肿瘤中发生的自然突变而最终产生更有效的疫苗。此外,还可能从血液、骨髓和胸腺分离出能够分化成免疫系统所有细胞类型(包括自然杀伤细胞、T-4 和 T-8 细胞,以及 B 或抗体产生细胞)的类孢子细胞。另外,树突状细胞(抗原呈递细胞)可由类孢子细胞进化得到。这将有可能会不仅利用各种类型肿瘤细胞,而且利用例如病毒、HIV 和细菌(例如炭疽)等微生物在体外刺激免疫系统。这样可提供一种产生针对肿瘤和例如 HIV 和炭疽热等感染性疾病的新疫苗的机制。此外,还可能在体外培养通过活检从肿瘤得到的类孢子细胞,并且可使用不同治疗剂来测试针对体外恶性类孢子细胞的作用,由此预测治疗剂为化疗剂、疫苗或辐射时患者的反应。就像从病弱的患者分离细菌并通过培养和敏感性测试以选择有效抗生素治疗一样,从活检样品分离肿瘤类孢子细胞将有可能进行肿瘤培养和化疗敏感性测试。此外,从患者分离的肿瘤类孢子细胞将适用于不断演变的分子诊断学和蛋白质组学领域,由此概述出患者肿瘤所需的诊断和治疗介入。

[0049] (ii) 肿瘤细胞的 DNA 修复

[0050] 活细胞中的 DNA 常常暴露于损伤剂,例如辐射、致癌物质和氧化。已知 DNA 受损与细胞的恶性转化相关联。因此,细胞因 DNA 修复基因的存在而受到保护,免于变为恶性。举例来说,如果某个人对于某一特定类型的癌症具有遗传倾向,那么在一些情况下,这种 DNA 修复系统的缺陷可得以证实。一个实例是遗传性非息肉病性结肠癌综合症。这种疾病由表现为家族性结肠癌的 DNA 修复缺陷组成。核苷酸错配可导致癌症。正常 DNA 修复基因将校正此错配,并由此防止肿瘤形成。近期的干细胞研究显示,神经元干细胞具有跟踪和追捕到迁移的胶质瘤(一种特定类型的脑肿瘤)细胞的能力。归因于此肿瘤追踪现象,使得神经干细胞中插入例如干扰素- γ 、肿瘤坏死因子和白细胞介素 12 等化学物质的基因。移植后,这些独特的干细胞随即能够追捕到脑肿瘤细胞,并通过分泌抗肿瘤化学剂损伤这些细胞。此外,近期的文献证实,成体干细胞当放入体内时能够与正常细胞融合。与上文论述的 DNA 修复相关的揭露内容可例如见于以下文献中:奥雷尼克(Ourednik)等人,自然生物技术(Nature Biotechnol),20(11):1103-1110(2002);斯蒂沃特(Stewart)等人,生物短评(Bioessays),24(8):708-13(2002);艾特撒(Ehtesam)等人,癌症疗法(Cancer Therapy),9(11):925-934(2002);艾特撒等人,癌症研究(Cancer Reserves),62(20):5657-63(2002);弗格森(Ferguson)等人,致癌基因(Oncogene)20(40):5572-9(2001)。

[0051] 因此,可使用本文中揭露的类孢子细胞群,使用通过追踪找寻到恶性细胞、融合和

DNA 修复的独特特性治疗肿瘤。据观察,在体外类孢子细胞与在培养物中与所述类孢子细胞一起生长的正常细胞群集并融合。类孢子细胞能够容易地从加有抗凝血剂的非制备型冷冻血液分离,并在培养物中扩增。与神经干细胞相反,这些类孢子细胞特别易于由血液得到,并且当培育时数量迅速增加。此外,类孢子细胞很小,因此,其因数量大、尺寸小和结构极为简单而与肿瘤细胞融合的机会较大。先前的描述基本上显示了膜结合 DNA 的很小且很简单的结构或袋。所有细胞都具有天然 DNA 修复系统。一个实例为核酸内切酶,其可切掉受损、缺陷型 DNA,随后使用 DNA 聚合酶,用正常 DNA 代替这些受损的 DNA 区段。随着细胞老化,其 DNA 修复系统失效,由此发生恶性转化。大部分的癌症治疗方法都集中在手术移除肿瘤以及使用肿瘤细胞杀灭机制,例如化疗、辐射或免疫疗法。这些方法伴随着显著的发病率,且并不总是有效。即使已知这些修复系统存在,但还没有使用 DNA 修复将肿瘤细胞转变成正常细胞的方法,并且癌症的发生涉及这些修复系统的失效。输注数十亿个源自于患者自身血液且具有可找寻并追捕到肿瘤细胞的新 DNA 修复系统的类孢子细胞将能够与肿瘤细胞融合,并将其 DNA 修复系统贡献给有缺陷的肿瘤细胞。其也可通过分泌具有营养作用的因子而对肿瘤细胞发挥修复作用。这些类孢子细胞可直接输注到肿瘤中或通过静脉内 (IV) 或腹膜内 (IP) 途径提供。由于此举将增强已知存在的天然 DNA 修复系统,故与例如化疗等较为传统的细胞自毁方法相比较,副作用将最小。由患者自身的血液可基本上产生无限数量的类孢子细胞来完成此任务。

[0052] 此外,还可使用基因插入技术将表达例如干扰素 γ 和肿瘤坏死因子等抗肿瘤物质的核苷酸序列插入类孢子细胞中。一旦输注,这些经过遗传工程改造的类孢子细胞就将追捕肿瘤细胞,并与其融合,由此将具有治疗作用的干扰素或 TNF 直接递送到肿瘤。此方法代表着现有技术的改进,因为类孢子细胞群可在体外扩增以供应无穷量的简单细胞结构,这些细胞结构可追捕、融合并由此修复肿瘤细胞中所发现的受损 DNA。现有技术已经证实,神经干细胞具有这些特性,但从患者采集神经干细胞可能伴随许多风险。这种治疗方法可用于治疗乳房、肺、脑和前列腺以及其它器官的癌症。

[0053] (iii) 退化性疾病的逆转

[0054] 基于基因的治疗方法或基因插入技术涉及特定核苷酸序列或基因的有效递送,此举将因所述特定基因产生的所需蛋白质的产生而引起临床改进。潜在应用包括用于癌症、疫苗、遗传和代谢病症以及包括病毒感染、心血管疾病和其它器官疾病状态在内的其它区域的治疗方法。基于基因的治疗方法的一个主要限制是找到一种适宜且有效的递送系统。已经针对基因插入和腺病毒载体以及随之发生的患者感染作了大量工作,因所需治疗基因的插入而引起所需蛋白质的表达。问题包括无效基因插入所需宿主细胞中,以及实际上感染宿主的病毒载体的有害作用。如实例中所证实,可容易地从包括体外扩增的血液的患者分离类孢子细胞群;可通过例如静脉内、腹膜内或皮下等各种途径将类孢子细胞安全地回输给患者。可使用例如瓦坎提等人,移值进展 (Transplantation Proceedings), 33:592-598 (2001) 中所揭露的技术等技术,在体外环境中插入编码例如因子 8 (用于治疗血友病) 等蛋白质的基因,使带有新治疗基因和产物的类孢子细胞群扩增。潜在应用的其它证据包括 Brdu 的表达,表明活性核酸的合成。此方法也可利用类孢子细胞群以重组技术实际在体外产生例如因子 8 等所需治疗蛋白,由此产生治疗蛋白。理想的情况是,有可能实现持久的体内作用。举例来说,可从血友病或戴萨克斯氏病 (Tay Sachs' s disease)

患者分离出血液类孢子细胞群,在体外插入基因,随后可将经基因校正的细胞(corrected cell)安全地再植入患者中,使有校正酶缺陷并治愈疾病的潜力的细胞增殖。导致疾病的任何已知基因酶缺陷都适于使用此方法处理。有可能治疗的遗传疾病包括例如亨廷顿氏病(Huntington's Disease)、肌肉萎缩症、家族性高胆固醇血症、囊肿性纤维化、苯酮尿症、血色病、镰状细胞贫血和糖原贮积病。随着人类基因组图谱的绘制,最终将研究出大多数导致疾病的遗传突变,为利用适当基因插入技术进行治疗提供了可能。自体源性类孢子细胞群可提供递送这些经校正基因所需的媒介。这些类孢子细胞群尺寸小以及分裂和允许插入治疗性核酸序列供表达的非凡能力的特性表明,这是一种合理的应用。基因插入可在体外利用仅包括所需基因序列的单独裸DNA于类孢子细胞中发生。此举将防止与使用例如腺病毒技术等病毒载体有关的任何种类的潜在危险。使用此基因插入模式可提供额外的治疗方法,例如插入核酸序列以制造治疗剂,例如肿瘤抑制蛋白或血管生成抑制剂,由此使肿瘤停止生长。可插入类孢子细胞群中的另一基因包括血管活性基因,例如VEGF,其用以治疗缺血性心脏病,由此避免旁路心脏手术的需求。类孢子细胞可表达将产生用于治疗囊肿性纤维化的蛋白质的CFTR基因,这些类孢子细胞已经通过循环行进到肺部,或已经通过支气管注射到肺中,由此移入肺组织中并发生分化,产生所需的基因产物来帮助治疗囊肿性纤维化的症状。

[0055] 如果需要大量产生所需产物,那么可利用生物可降解的骨架材料、水凝胶或例如从冷冻血液和其它组织(例如心脏、肺和CSF)分离的天然来源的基质植入类孢子细胞。基因插入疗法之前的一个局限性是产物量随时间推移可能会因经基因校正的细胞在体内耗散并最终消失而减少。使用在天然或生物可降解骨架上插入基因核苷酸的类孢子细胞群产生组织构筑体,将是克服此限制的一种方式。

[0056] 用于授予细胞的结构和制剂

[0057] 可借助包括单独或在载体或支撑结构之上或之中的类孢子细胞群的组合物,将细胞群授予患者。在许多实施例中,将不需要载体。通过将类孢子细胞注射到需要所述细胞的部位之上或之中来进行授予。在这些情况下,类孢子细胞通常将通过洗涤移除细胞培养基,并且将悬浮于生理性缓冲液中。

[0058] 在其它实施例中,细胞将具备支撑结构,或将被合并到支撑结构之上或之中。支撑结构可为网格、固体支撑物、管、多孔结构和/或水凝胶。支撑结构在整体上或部分上可为生物可降解或非生物可降解的。所述支撑物可由天然或合成聚合物、金属(例如钛)、骨骼或羟磷灰石或陶瓷形成。天然聚合物包括胶原蛋白、透明质酸、多糖和葡糖胺聚糖。合成聚合物包括聚羧基酸(例如聚乳酸、聚乙醇酸和其共聚物)、聚羧基烷酸酯(例如聚羧基丁酸酯)、聚原酸酯、聚酸酐、聚氨酯、聚碳酸酯和聚酯。

[0059] 固体支撑物

[0060] 支撑物结构可为松散的编织或非编织网格,其中细胞被接种于网格中和网格上。所述结构可包括固体结构支撑物。所述支撑物可为管,例如用于使神经轴突再生长的神经管。所述支撑物可为支架或瓣膜。所述支撑物可为例如膝关节或髋关节等关节或其部分的假体,其具有多孔界面,允许细胞内生长和/或将细胞接种于多孔结构中。

[0061] 支撑物结构可为一种可渗透结构,其具有成形并且支撑水凝胶-细胞混合物的孔状腔或空隙。举例来说,支撑物结构可为多孔聚合物网格、天然或合成海绵,或者由金属或

例如骨骼或羟磷灰石等材料形成的支撑物结构。支撑物结构的孔隙度应使得养分能扩散到结构中,由此有效地到达细胞内部,并且由细胞产生的废物可扩散到结构外。

[0062] 支撑物结构可成形为符合所需新组织的空间。举例来说,支撑物结构可成形为符合烧伤的皮肤区域或者损失的软骨或骨骼部分的形状。根据制造的材料,支撑物结构可通过切割、成型、浇铸或任何产生所需形状的任何方法成形。支撑物可在用细胞接种或用水凝胶-细胞混合物填充支撑物结构之前或之后成形,如下文所述。

[0063] 其它因子,例如生长因子、诱导分化或脱分化的其它因子、分泌产物、免疫调节剂、消炎剂、退化因子、促进神经支配 (innervation) 或增强淋巴网络的生物活性化合物和药物,都可并入聚合物支撑物结构中。

[0064] 适合聚合物的实例是丙交酯乙交酯共聚酯 (polyglactin),其为乙交酯与丙交酯的 90 : 10 共聚物,并且被制造为 VICRYL™ 编织型可吸收缝合线 (艾斯顿公司 (Ethicon Co.), 新泽西州萨默维尔市 (Somerville, N. J.))。聚合物纤维 (例如 VICRYL™) 可被编织或压制成毛毡状聚合物薄片,其接着可被切割成任何所需的形状。或者,聚合物纤维可在模具中压制在一起,所述模具将聚合物纤维浇铸成支撑物结构所需的形状。在一些情况下,可将其它聚合物添加到聚合物纤维内,因为这些聚合物经成型以修改或赋予纤维网格其它结构。举例来说,可将聚乳酸溶液添加到此聚乙醇酸纤维网格薄片,并且可一起成型所述组合以形成多孔支撑物结构。聚乳酸结合聚乙醇酸纤维的交联物,由此用这些物质涂覆个别纤维,并固定经成型纤维的形状。聚乳酸还填充于各纤维之间的空间中。因此,可根据引入支撑物中的聚乳酸的量改变孔隙度。将纤维网格成型成所需形状所需的压力可能相当温和。所需要的只是将纤维固持在合适的位置,保持足够长时间以发挥聚乳酸的结合和涂覆作用。

[0065] 或者,或另外,支撑物结构可包括由此项技术中已知的技术制造的其它类型的聚合物纤维或聚合物结构。举例来说,可通过蒸发聚合物溶液中的溶剂获得薄聚合物膜。如果由具有所需形状的凸纹图案的模具蒸发聚合物溶液,那么可将这些膜浇铸成所需形状。也可使用此项技术中已知的压缩成型技术将聚合物凝胶成型成薄的可渗透聚合物结构。

[0066] 许多其它类型的支撑物结构也是可能的。举例来说,支撑物结构可由海绵、泡沫状物、珊瑚或具有内部孔的生物相容性无机结构,或由交错编织的聚合物纤维制成的网格薄片形成。这些支撑物结构可使用已知方法制备。

[0067] 水凝胶

[0068] 在另一实施例中,细胞与水凝胶混合以形成细胞-水凝胶混合物。此细胞-水凝胶混合物可直接施用于受损组织。举例来说,如美国专利第 5,944,754 号中所述,水凝胶-细胞混合物可简单地刷涂、浸渍或喷涂到所需表面上,或者倾倒或以其它方式施用以填充所需腔或装置。水凝胶提供一种供细胞粘附和生长的薄基质或骨架。当与患者的病症相关的组织具有不规则形状时,或当将细胞施用于远端部位时 (例如,当将类孢子细胞置于肾囊之下以治疗糖尿病时),这些投药方法可能特别适合。

[0069] 或者,可将水凝胶-细胞混合物引入可渗透的生物相容性支撑物结构中,以致所述混合物基本上填充支撑物结构,并且当其凝固时呈现支撑物结构的形状。因此,支撑物结构可导引由置于其中的类孢子细胞或其子代成熟的组织的发育和形状。如下文进一步描述,支撑物结构可在用水凝胶-细胞混合物填充之前或之后提供给患者。举例来说,支撑物

结构可置于组织（例如皮肤、肝脏或骨骼系统的受损区域）内，随后使用注射器、导管或其它适合装置用水凝胶-细胞组合物进行填充。需要时，可使支撑物结构的形状符合受损组织的形状。在以下小节中将描述适合的支撑物结构、水凝胶和递送方法。

[0070] 水凝胶应为生物相容、生物可降解的，能够维持活细胞且优选能够在体内迅速（例如在递送到支撑物结构之后约 5 分钟内）凝固。大量细胞可均匀分布于水凝胶内。水凝胶通常可支撑约 5×10^6 个细胞 / 毫升。水凝胶还能够扩散以使养分到达细胞并带出废物。

[0071] 可使用多种不同的水凝胶。这些水凝胶包括（但不限于）：(1) 在体温下凝固或凝结的温度相关性水凝胶（例如 PLURONICS™）；(2) 通过离子交联的水凝胶（例如海藻酸钠）；(3) 通过曝露于可见光或紫外光凝结的水凝胶（例如具有丙烯酸酯端基的聚乙二醇聚乳酸共聚物）；和 (4) 在 pH 改变时凝结或凝固的水凝胶（例如 TETRONICS™）。所属领域技术人员已知用于合成上述其它聚合物的方法。参看例如聚合物科学与工程简明百科全书 (Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering), J. I. 克洛维兹 (J. I. Kroschwitz) 编, 约翰威立出版公司 (John Wiley and Sons), 纽约州纽约市 (New York, N. Y.), 1990。许多聚合物, 例如聚（丙烯酸）、海藻酸盐和 PLURONICS™ 都是市售的。

[0072] 可使用离子型多糖（例如海藻酸盐或壳聚糖）来悬浮活细胞, 包括类孢子细胞和其子代。这些水凝胶可通过使海藻酸（一种从海藻分离的碳水化合物聚合物）的阴离子盐与例如钙阳离子等离子交联来制造。水凝胶的强度随钙离子或海藻酸盐的浓度增加而增加。美国专利第 4, 352, 883 号描述了海藻酸盐与二价阳离子在水中于室温下发生离子交联, 形成水凝胶基质。

[0073] 将类孢子细胞子群与海藻酸盐溶液混合。将所述溶液递送到已经植入的支撑物结构, 随后其因体内生理浓度的钙离子的存在而在短时间内凝固。或者, 在植入前将溶液递送到支撑物结构, 并使其在含钙离子的外部溶液中凝固。

[0074] 一般说来, 这些聚合物可至少部分溶于水溶液（例如水、具有带电侧基的水性醇溶液或其单价离子盐）。存在许多带有可与阳离子（例如聚（磷腈）、聚（丙烯酸）和聚（甲基丙烯酸））反应的酸性侧基的聚合物的实例。酸性基团的实例包括羧酸基团、磺酸基团和卤代（优选氟代）醇基团。带有可与阴离子反应的碱性侧基的聚合物的实例为聚（乙烯基胺）、聚（乙烯基吡啶）和聚（乙烯基咪唑）。

[0075] 通过使带有带电侧基的水溶性聚合物与含有带相反电荷的多价离子的水溶液反应来使聚合物交联, 所述多价离子当所述聚合物具有酸性侧基时为多价阳离子, 或当所述聚合物具有碱性侧基时为多价阴离子。用于使聚合物与酸性侧基交联形成水凝胶的阳离子包括二价和三价阳离子, 例如铜、钙、铝、镁和镉。将这些阳离子盐的水溶液添加到聚合物中以形成柔软、高度膨胀的水凝胶。

[0076] 用于使聚合物交联形成水凝胶的阴离子包括二价和三价阴离子, 例如低分子量二羧酸根离子、对苯二甲酸根离子、硫酸根离子和碳酸根离子。将这些阴离子盐的水溶液添加到聚合物中以形成柔软、高度膨胀的水凝胶, 如关于阳离子所述。

[0077] 为防止抗体进入水凝胶但允许养分进入, 水凝胶中有用聚合物的尺寸在介于 10kDa 与 18.5kDa 之间的范围内。较小的聚合物产生密度较高且孔较小的凝胶。

[0078] 也可使用温度相关性或热敏感性水凝胶。这些水凝胶具有所谓的“反向胶凝

(reverse gelation)”特性,即,其在室温或低于室温下为液体,并且当升温到较高温度(例如体温)时发生胶凝。因此,这些水凝胶易于在室温或低于室温下以液体形式施用,并且当升温到体温时自动形成半固体凝胶。结果,当首先将支撑物结构植入患者体内,随后用水凝胶-细胞组合物填充时,这些凝胶特别适用。所述温度相关性水凝胶的实例为 PLURONICS™(巴斯夫-莱多特公司(BASF-Wyandotte)),例如聚氧乙烯-聚氧丙烯 F-108、F-68 和 F-127、聚(N-异丙基丙烯酰胺)和 N-异丙基丙烯酰胺共聚物。

[0079] 这些共聚物可用标准技术操作以影响其物理特性,例如孔隙度、降解速率、转变温度和硬度。举例来说,在盐存在和不存在下添加低分子量糖会影响典型热敏感性聚合物的下限临界溶解温度(lower critical solution temperature, LCST)。此外,当通过在 4℃ 下分散来制备浓度在介于 5% 与 25% (W/V) 范围内的这些凝胶时,粘度和凝胶-溶胶转变温度会受到影响,所述凝胶-溶胶温度与浓度呈反相关。这些凝胶具有能够使类孢子细胞和其子代存活并得到滋养的扩散特征。

[0080] 美国专利第 4,188,373 号描述使用 PLURONIC™ 多元醇的水性组合物来提供热胶凝水性系统。美国专利第 4,474,751 号、第 4,474,752 号、第 4,474,753 号和第 4,478,822 号描述利用热凝性聚氧亚烃基凝胶的药物递送系统。利用这些系统,凝胶转变温度和/或凝胶硬度二者都可通过调整 pH 值和/或离子强度以及聚合物的浓度加以改变。

[0081] 其它适合的水凝胶具 pH 相关性。这些水凝胶在等于、低于或高于特定 pH 值下为液体,并且当暴露于特定 pH 值(例如 7.35 到 7.45,即人体内细胞外流体的正常 pH 范围)时胶凝。因此,这些水凝胶能够以液体形式容易地递送到植入的支撑物结构,并在暴露于体内 pH 时自动形成半固体凝胶。所述 pH 相关性水凝胶的实例为 TETRONICS™(巴斯夫-莱多特公司)、乙二胺的聚氧乙烯-聚氧丙烯聚合物、聚(甲基丙烯酸二乙基氨基乙酯-g-乙二醇)和聚(甲基丙烯酸 2-羟基甲酯)。这些共聚物可通过标准技术操作以影响其物理特性。

[0082] 可用于授予类孢子细胞或其子代的其它水凝胶可借助可见光或紫外光凝固。这些水凝胶由包括水溶性区域、生物可降解区域和至少两个可聚合区域的大分子单体制成(参看例如美国专利第 5,410,016 号)。举例来说,水凝胶可以生物可降解、可聚合大分子单体开始,所述大分子单体包括核心、在核心每一端上的延伸和在每一延伸上的端帽(end cap)。所述核心为亲水性聚合物,延伸为生物可降解聚合物,且端帽为能够使大分子单体在暴露于可见光或紫外光(例如长波长紫外光)时交联的寡聚物。

[0083] 所述光凝固水凝胶的实例包括聚氧乙烯嵌段共聚物、具有丙烯酸酯端基的聚乙二醇聚乳酸共聚物以及两端由丙烯酸酯封端的 10K 聚乙二醇-乙交酯共聚物。与 PLURONIC™ 水凝胶相同,这些包含所述共聚物的水凝胶可通过标准技术操作以改变其物理特性,例如降解速率、结晶度差异和硬度。

[0084] 水凝胶可通过注射或导管或者在植入其它支撑物结构时授予。交联可在授予之前、期间或之后发生。

[0085] 除非另作定义,否则本文中使用的所有科技术语都具有与本发明所属领域技术人员通常所了解相同的含义。本文中引用的出版物以及这些出版物中引用的材料都明确地以引用的方式并入本文中。

[0086] 实施例

[0087] 使用专利申请案中所述的方法,从骨髓以及数个代表内胚层、中胚层和外胚层的组织中分离类孢子细胞群。分离后立即将细胞放入由 DMEM/F12 及抗生素 B27、FGF 和 EGF 构成的称为“基础培养基”的培养基中。细胞在此基础培养基中维持数周,在此期间,执行连续研究以鉴别这些细胞所表达的标记物。使用基因表达分析和免疫组织化学针对蛋白质表达的鉴别来鉴别标记物。

[0088] 在暴露于“基础培养基”的同时,分析从代表内胚层、中胚层和外胚层的组织获取的类孢子细胞中与胚胎干细胞相关的标记物的表达。从内胚层组织(肺和肝脏)、中胚层组织(肌肉)和外胚层组织(脊髓和肾上腺)获得的类孢子细胞群都表达与骨髓获取的类孢子细胞相同的基因和蛋白质标记物组,并且当维持于“基础培养基”中时不存在与骨髓源性类孢子细胞相同的标记物。

[0089] 随后将细胞暴露于三种分化培养基中的一种:内胚层分化培养基、中胚层分化培养基和外胚层分化培养基。各培养基的组成如下:

[0090] 内胚层分化培养基:肝细胞培养基抗坏血酸、BSA-FAF、氢化可的松(hydrocortisone)、转铁蛋白、胰岛素、hEGF、吉诺霉素(genomycin)加 10%胎牛血清。

[0091] 中胚层分化培养基:DMEM 加 20%胎牛血清。

[0092] 外胚层分化培养基:加有 10%胎牛血清的由 DMEM/F12 加 B27、B27 FGF、EGF 构成的基础培养基。

[0093] 当将类孢子细胞群(包括从骨髓和所述代表性组织中每一者获取的解聚细胞团)暴露于如上文所述补充的各“分化培养基”时,如由已知蛋白质和基因标记物的表达所确定,细胞根据所用培养基而分化成内胚层、中胚层或外胚层的代表性细胞,即,当使用内胚层分化培养基时,细胞表达与内胚层组织一致的以下蛋白质标记物:细胞角蛋白 18、白蛋白和 α 胎蛋白。也表达基因标记物 GATA4。

[0094] 当使用中胚层分化培养基时,细胞表达与中胚层组织一致的以下蛋白质标记物:肌球蛋白(myosin)、肌间线蛋白(desmin)、 α 平滑肌肌动蛋白。也表达基因标记物 burachyury。

[0095] 当使用外胚层分化培养基时,细胞表达与外胚层组织一致的以下蛋白质标记物:巢蛋白、Map2 β -III 微管蛋白(二者都为神经元标记物)、04(少突细胞的标记物)、GFAPs(胶质细胞的标记物)。Map2 的表达也通过基因表达分析验证。

[0096] 所属领域技术人员应了解,最普遍认可的用以确定三种胚层的分化的标记物是 α 胎蛋白(对于内胚层)、 α 平滑肌肌动蛋白(对于中胚层)和 β -III 微管蛋白(对于外胚层)的表达,所有这些蛋白质通常都是在这些组织发育的最早期表达。此外,基因标记物 map2、burachyury 和 gata4 都是在胚胎胚层形成的极早期表达。

[0097] 结果

[0098] (i) 骨髓源性类孢子细胞:

[0099] 从骨髓分离的类孢子细胞群在数天内产生多个细胞团。包含在所述细胞团内或单独的个别细胞表达以下基因标记物,所有这些标记物都与胚胎干细胞相关:Oct4、Nanog、Dax1、Fgf4、Zfp296、Cripto、Gdf3、Utl1、Cdx2、Ecat1、Esg1、Sox2 和 Pax6、cMyc(增殖性基因)、Fgf5、Olig2 和 Pdgfr12。也观察到标记物巢蛋白(一般与神经干细胞相关的标记物)。

[0100] Oct4 是 POU 转录因子,且 nanog 是 NK-2 类同源异型盒转录因子,二者都与胚胎干细胞未分化状态和多能性的维持有关。(潘 (Pan) 等人,细胞研究 (Cell Res.),12:321-329(2002);克拉克 (Clark) 等人,干细胞 (Stem Cells),22:169-179(2004);丹羽 (Niwa),发育学 (Development),134:635-646(2007))。Cripto(畸胎瘤源性生长因子 1;在内层细胞团中早期表达的标记物)是一种多功能细胞表面蛋白,在脊椎动物胚胎发生中起到重要作用(斯曲兹 (Strizzi),致癌基因,24:5731-5741(2005))。GDF3 是 TGF β 配体超家族的成员,特定地以多能状态表达(莱维 (Levine),发育学,133:209-16(2005))。未分化胚胎转录因子 (Undifferentiated embryonic transcription factor, Utf1) 最初被鉴别为在小鼠胚胎干细胞中以干细胞特异性方式表达的转录辅因子。Utf1 是针对多能性的假定标记物(丹羽,细胞结构和功能 (Cell Structure and Function),26(3):137-148(2001))。胚胎干细胞相关性转录物 1 (Embryonic stem cell associated transcript 1, Ecat1) 是胚胎干细胞相关性转录基因 (trans gene)。胚胎干细胞特异性基因 (Embryonic stem cell-specific gene, Esg1) 编码含 KH 结构域的蛋白,在包括 ES 细胞、胚胎胚细胞和专能生殖系干细胞在内的多能细胞中表达(静音-筱原 (Kanatsu-Shinohara),细胞 (Cell),1001-1012(2004))。性别决定区 (sex determining region, SRY) 盒 2, 又称 Sox2 和 Pax6, 是与 ES 细胞和神经干细胞相关的标记物。Sox2 是诱导性多能干细胞中所需的一个关键转录因子(赵 (Zhao), 细胞生物化学杂志 (J. Cell Biochem.) 105(4):949-55(2008))。巢蛋白是主要在来自中枢神经系统的干细胞中表达的 VI 类中间丝蛋白(弗雷德瑞斯坎 (Fredericksen) 等人,神经科学杂志 (J. Neurosci), 8:1144-51(1988))。因此,从骨髓获得的类孢子细胞表达指示多能性的标记物。

[0101] 如由免疫组织化学所证实,这些细胞还表达与胚胎干细胞相关的以下蛋白质标记物:C-kit 和 Sca1(表面标记物)以及 E-钙粘素。

[0102] 应注意一个事实:从骨髓分离的类孢子细胞针对以下胚胎干细胞标记物染色呈阴性:Dax1、成纤维细胞生长因子 4(fibroblast growth factor 4, Fgf4)、尾侧型同源异型盒转录因子 2(caudal type homeobox transcription factor 2, Cdx2)、Neo 和 Eras(ES 的肿瘤形成基因)和 Rex 1。这些细胞针对神经嵴干细胞标记物 P75 染色呈阴性。其也不表达以下蛋白质标记物: Cd45、Cd31 或 Cd34(内皮细胞和造血干细胞标记物)。

[0103] (ii) 肌肉

[0104] 从肌肉获得的类孢子细胞最初表达与利用从骨髓获得的类孢子细胞所观察相同的胚胎干细胞标记物,即,所述细胞表达 Oct4、Dax1、Fgf4、Zfp296、Cripto Gdf3、Utf1、Cdx2、Ecat1、Esg1、Sox2 和 Pax6、cMyc、Fgf5、Olig2、Pdgfr12。

[0105] 与骨髓源性类孢子细胞相同,肌肉源性类孢子细胞针对 Dax1、Fgf4、Cdx2、Neo 和 Eras、Rex 1(胚胎干细胞标记物)、P75(神经嵴标记物)、Cd45 或 Cd31(内皮细胞和造血干细胞标记物)染色呈阴性。

[0106] 从肌肉分离的类孢子细胞在形成多个细胞团(呈球形式)之后,对这些细胞进行研究。

[0107] 这些细胞球在早达几天内开始形成,但在初始分离后至少 3 周末测试到标记物。细胞球最终生长到直径超过 300 微米的尺寸。由肌肉类孢子细胞形成的细胞球针对以下标记物染色呈阳性:ckit,一种指示干细胞(未必为胚胎干细胞(ESC))的细胞表面标记物。

在 3 周时这些细胞球中约 50% 的细胞呈阳性,但在 90 天时仅 1% 到 5% 呈阳性 (这表明当这些细胞成熟时,其逐渐丧失其“干细胞性 (stem cellness)”)。

[0108] 也对从肌球 (myosphere) 脱落的细胞进行分析。这些细胞是由肌球生长并成熟时获得并脱落的细胞。针对干细胞抗原 1 (Sca-1)、CD31 和 CD45 的抗体都直接与 PE 偶联。针对 CD29、CD34 和 CD90 的抗体都直接与 FITC 偶联。细胞球中的细胞对以下标记物呈阳性: SCA-1、CD29、CD34、CD90 和 B1 整合素,而其对作为较成熟细胞的造血细胞和内皮细胞的标记物 CD31、CD45 呈阴性。标记物的表达随传代次数而变化。当从细胞球脱落的细胞附着时,其首先失去不成熟标记物 CD90,随后开始失去 Sca-1。另外,肌球细胞不表达成熟细胞标记物 MyoD,并且极少表达或不表达 Pax7 和 Myf5。

[0109] 然而,当接种这些肌球时,粘附细胞成熟而表达 Pax7、MyoD 和肌间线蛋白,并在添加到分化培养基中后融合形成多核肌小管。接种到成脂培养基和成骨培养基中的肌球细胞分化成脂肪和骨骼。当肌球源性细胞用 GFP 标记,随后注射到肌肉中时,其产生 GFP 标记的肌肉纤维。通过形成肌球产生的细胞为专能干细胞,因为其不表达肌源性标记物,例如: Pax7、Myf5 和 MyoD,而在其成熟时,其表达这些标记物,并且能够形成多核肌小管、成脂细胞和成骨细胞,且可在体内使受损的肌肉再生。针对 MyoD (核)、肌间线蛋白 (细胞质) 和 Sca1 (表面) 的染色显示黄 - 红色。针对 Pax7 (核) 的染色显示绿色。这些发现利用反转录酶 PCR 确定,因为肌球为肌肉形成前细胞,并且其不表达 Pax7、Myf5 或 MyoD。而从肌球脱落的细胞附着且随后成熟,以表达 Pax7、Myf5 和 MyoD。

[0110] (iii) 肺

[0111] 利用从肺分离的类孢子细胞观察到类似的时间相关性标记物表达。从肺分离的类孢子细胞最初表达 cKit,随后表达巢蛋白。

[0112] 之后,从细胞球脱落的细胞表达 SP-C (肺泡中 II 型内皮细胞的标记物;基因表达和蛋白质分析) 和 CC10 (针对克拉拉细胞 (Clara cell);基因表达和蛋白质分析)。

[0113] (iv) 肾上腺

[0114] 肾上腺表达极早期干细胞标记物,随后成熟以表达嗜铬细胞和制造儿茶酚胺的细胞的标记物。当最初分离时,与来自骨髓的细胞相同,从肾上腺获得的类孢子细胞表达 Oct4、Dax1、Fgf4、Zfp296、Cripto、Gdf3、Utf1、Cdx2、Ecat1、Esg1、Sox2 和 Pax6、cMyc、Fgf5、Olig2、Pdgfr12。

[0115] 类似地,肾上腺源性类孢子细胞针对 Dax1、Fgf4、Cdx2、Neo 和 Eras、Rex 1 (胚胎干细胞标记物)、P75 (神经嵴标记物)、Cd45 或 Cd31 (内皮细胞和造血干细胞标记物) 染色呈阴性。

[0116] 按时表达成熟细胞标记物: SF1 (肾上腺皮质的类固醇激素合成标记物)、DAX1、SCG10 祖细胞、嗜铬细胞 (cromaffin)。

[0117] (v) 脑和外周神经系统

[0118] 脑和外周神经系统包括: 脑、脊髓和外周神经。在这些组织中,已经鉴别出胚胎标记物 Sca-1 和 Oct-4。其成熟以显示巢蛋白、外周神经中其它神经标记物和许旺氏细胞 (Schwann cell) 的标记物。

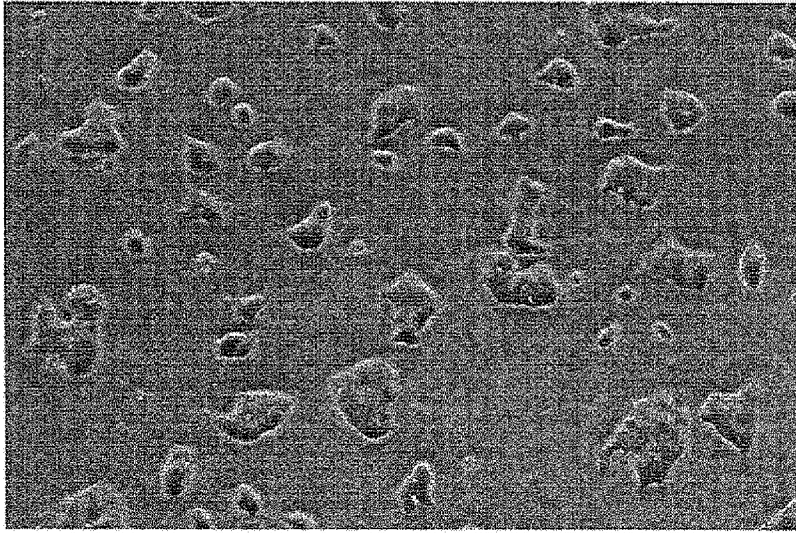


图 1