



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101595212 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 30

(21) 申请号 200780045631. 3

(22) 申请日 2007. 10. 11

(30) 优先权数据

60/829, 238 2006. 10. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 06. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/021708 2007. 10. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/045498 EN 2008. 04. 17

(73) 专利权人 伊西康公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·C·科尔特 A·西达

C·S·比恩苏西索 A·戈西夫斯卡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 梁谋 付磊

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2005021738 A1, 2005. 03. 10,

W0 02061053 A1, 2002. 08. 08,

CN 1307643 A, 2001. 08. 08,

Costanza Sagrinati 等. Isolation and Characterization of Multipotent Progenitor Cells from the Bowman's Capsule of Adult Human Kidneys. 《Journal of the American Society of Nephrology》. 2006, 第 17 卷 (第 9 期),

Costanza Sagrinati 等. Isolation and Characterization of Multipotent Progenitor Cells from the Bowman's Capsule of Adult Human Kidneys. 《Journal of the American Society of Nephrology》. 2006, 第 17 卷 (第 9 期),

王跃春等. 人胎肾间充质样干细胞分离鉴定及其向脂肪和成骨细胞的分化. 《中国临床康复》. 2006, 第 10 卷 (第 25 期),

审查员 吕健

权利要求书1页 说明书40页

(54) 发明名称

肾源细胞及在组织修复和再生中的使用方法

(57) 摘要

本发明提供得自哺乳动物肾脏组织的分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群。提供分离和纯化哺乳动物肾源细胞群的方法。提供通过给予哺乳动物患者分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群治疗肾病的方法。

1. 一种分离或纯化的人肾源细胞群,所述细胞群能够在培养物中自我更新和扩增,其中所述细胞群对细胞表面标记 HLA I 和 CD44 的表达为阳性以及对 Oct-4、Rex-1、Pax-2、钙粘素 -11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7 或 GDF5 中至少一种的表达为阳性,且对细胞表面标记 CD133 和 E 钙粘素的表达为阴性,以及对 Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2 或 GATA-4 中至少一种的表达为阴性。

2. 权利要求 1 的细胞群,所述细胞群对细胞表面标记 CD24、CD29、CD49c、CD73、CD90、CD166 或 SSEA-4 中的至少一种为阳性,且对细胞表面标记 HLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD138 或 CD141 中的至少一种为阴性。

3. 权利要求 1 的细胞群,所述细胞群对细胞表面标记 HLA II、CD80 或 CD86 中的至少一种为阴性。

4. 权利要求 3 的细胞群在制备用于通过同种异体移植对人患者进行治疗的试剂中的用途。

5. 权利要求 1 的细胞群,其中所述细胞来源于肾皮质。

6. 权利要求 1 的细胞群,其中所述细胞来源于肾髓质。

7. 权利要求 1 的细胞群,其中所述细胞来源于肾包膜下区。

8. 权利要求 1 的细胞群,其中所述细胞群分泌营养因子 FGF2、HGF、TGF  $\alpha$ 、TIMP-1、TIMP-2、MMP-2 或 VEGF 中的至少一种,且不分泌营养因子 PDGF-bb 或 IL12p70 中的至少一种。

9. 权利要求 1-3 和 5-8 中任一项的细胞群在制备用于在人患者中提供保护和修复肾脏的营养因子的试剂中的用途。

10. 权利要求 9 的用途,其中所述细胞群用于诱导选自以下的作用:(a) 形成向缺血组织供应血液的血管;(b) 血液流向缺血组织;(c) 向缺血组织供应氧;和(d) 它们的组合。

11. 权利要求 9 的用途,其中所述细胞群用于诱导形成肾包膜下区组织、肾皮质组织或肾髓质组织。

12. 权利要求 1-3 和 5-8 中任一项的细胞群在制备用于在人患者中提供肾保护或肾再生的试剂中的用途。

13. 权利要求 12 的用途,其中所述细胞群用于肾脏损伤之后的肾再生。

## 肾源细胞及在组织修复和再生中的使用方法

### 相关申请的交叉参考

[0001] 本申请要求保护 2006 年 10 月 12 日申请的美国临时申请号 60/829,238 的利益,该临时申请整体在此引入作为参考。

### 发明领域

[0002] 本发明一般地涉及得自哺乳动物肾脏组织的分离的或纯化的哺乳动物肾源细胞群。本发明进一步涉及分离和纯化哺乳动物肾源细胞群的方法。提供通过给予哺乳动物患者分离的或纯化的肾源细胞群从而治疗肾脏疾病的方法。

### 发明背景

[0003] 肾脏的毒性和缺血性损害导致急性肾衰竭,最常见的表现为急性肾小管坏死。在急性肾衰竭后的肾功能恢复依赖于用功能性肾小管上皮取代坏死的肾小管细胞。另外,在缺血性损伤后观察到肾小球和肾小管周毛细血管内皮的显著增殖性响应。没有或降低上皮和内皮再生可使患者易患肾小管间质性肾瘢痕和慢性肾病。最初未确定新产生的肾细胞的起源,但通过对其它器官类推,已提出器官特异性多能细胞(即肾干细胞)为新细胞的前体。然而,没有鉴定出成人肾祖细胞。Bussolati 等, *American J. of Pathology*, 166 : 545-555, 2005。

[0004] 没有结论性的证据证实肾祖细胞的分离和培养。虽然如此,一些实验室仍已进行了一些鉴定和分离这些细胞的尝试。例如,在啮齿动物中的研究表明,肾乳头是成人肾干细胞的微环境。进一步的实验证实,分离的肾乳头性细胞具有一定程度的多能分化,当被直接注射到肾皮质中时,它们移植到肾薄壁组织中。这些结果提示,肾乳头是涉及肾维持和修复的肾祖细胞群的微环境。然而,仍要确定在人肾脏中存在此祖细胞微环境。Oliver 等人, *J. of Clinical Investigation*, 114 : 795-804, 2004。PCT 国际申请号 W02005/021738。

[0005] 推定的人祖细胞分离自尸体肾脏的肾组织。这些细胞的分离基于针对表面标记 CD133 的磁珠细胞分离。进一步的实验表明,肾源 CD133<sup>+</sup> 细胞有能力在培养物中扩增,并在体外分化为上皮细胞或内皮细胞。在植入 SCID 小鼠中时, CD133<sup>+</sup> 细胞形成表达肾上皮标记的管状结构。另外,静脉内注射到具有甘油诱导的肾小管坏死的小鼠中的 CD133<sup>+</sup> 细胞迁移并整合到受伤的肾脏组织中。Bussolati 等, *American J. of Pathology*, 166 : 545-555, 2005。这些数据表明,祖细胞存在于人肾脏组织中,它们可能在肾修复中起作用。然而,在成人肾脏组织中驻留的 CD133<sup>+</sup> 细胞群非常低,因此对基于异种的细胞疗法是不切实际的。最近鉴定器官特异性干细胞的方法利用基于祖细胞流出 Hoechst 33342 染料的能力的分离方法。表现出该能力的细胞被称为 SP(侧群)细胞,已显示出可变程度的干细胞特征。研究已表明,啮齿动物肾脏的肾间质含有 SP 细胞。另外,将肾 SP 细胞输注入患有急性肾衰竭的小鼠中。Hishikawa 等人, *J. of Cell Biology*, 169 : 921-928, 2005。这些细胞似乎迁移到胞间隙,并在受损的肾组织修复中起作用。然而,仍要确定在人肾脏组织中存在 SP 细胞。在本领域需要改善的哺乳动物或人肾源细胞源用于细胞疗法,该细胞源可分离自正常哺乳

动物或人肾脏组织,并在细胞培养物中生长。发明概述

[0006] 本发明提供得自哺乳动物肾脏组织的分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群。提供用于分离和纯化哺乳动物肾源细胞群的方法。独特的哺乳动物肾源细胞群的特征在于表型特征,例如形态、生长潜力、表面标记表型、早期发育基因表达和肾发育基因表达。表面标记和基因表达表型在哺乳动物肾源细胞群于培养物中多次传代后 仍被保留。

[0007] 在本发明的一个方面,提供分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群,所述细胞群能够在培养物中自我更新和扩增,其中所述细胞群对 Oct-4、Rex-1、Pax-2、钙粘素 -11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7 或 GDF5 中至少一种的表达为阳性,且对 Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2 或 GATA-4 中至少一种的表达为阴性。在一个实施方案中,所述细胞对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性,且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性。

[0008] 在又一方面,分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群对细胞表面标记 HLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD166 或 SSEA-4 中的至少一种为阳性,且对细胞表面标记 HLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141 或 E- 钙粘素中的至少一种为阴性。在一个实施方案中,细胞群对表面标记 HLA I、CD166 或 SSEA-4 中的至少一种为阳性,并对细胞表面标记 HLA II、CD80、CD86、CD133、CD141 或 E- 钙粘素中的至少一种为阴性。在又一个实施方案中,细胞群对细胞表面标记 HLA I 为阳性,且对细胞表面标记 HLA II、CD80 或 CD86 中的至少一种为阴性。细胞群优选对哺乳动物患者的异体移植为非免疫原性的。哺乳动物肾源细胞群可分泌营养因子 FGF2、HGF、TGF  $\alpha$ 、TIMP-1、TIMP-2、MMP-2 或 VEGF 中的至少一种。优选地,所述细胞群不分泌营养因子 PDGF-bb 或 IL12p70 中的至少一种。

[0009] 哺乳动物肾源细胞群可来源于肾包膜下区、肾皮质或肾髓质。哺乳动物肾源细胞群可包含肾祖细胞。哺乳动物肾源细胞群可来源于人、灵长类动物或啮齿类动物。

[0010] 本发明的另一方面涉及治疗哺乳动物患者的缺血性肾脏疾病的方法,该方法包括给予哺乳动物患者治疗有效量的如上所述的分离的或纯化的哺乳动物肾源细胞群,由此减弱或消除哺乳动物患者的缺血性肾脏疾病。

[0011] 还提供替代哺乳动物患者由于外伤、衰老、代谢性或毒性伤害、疾病或特发性病症(idiopathic loss)而损伤的肾组织、器官、组分或结构的方法。该方法包括给予哺乳动物患者治疗有效量的分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群,由此减轻或消除哺乳动物患者的受损组织或器官并恢复肾功能。

[0012] 本发明的又一方面涉及选择性富集或分离哺乳动物肾源细胞群的方法。该方法包括由哺乳动物肾脏的包膜下区、皮质或髓质获得组织,在金属蛋白酶、中性蛋白酶或粘多糖酶存在下温育组织,将细胞接种在组织培养容器中,鉴定对 Oct-4、Rex-1、Pax-2、钙粘素 -11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7 或 GDF5 中至少一种的表达为阳性并对 Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2 或 GATA-4 中至少一种的表达为阴性的细胞群,并分离哺乳动物肾源细胞群。在又一方面,细胞群对细胞表面标记 HLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD166 或 SSEA-4 中的至少一种为阳性,且对细胞表面标记 HLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141 或 E- 钙粘素中的至少一种为阴性。

[0013] 还提供用基因疗法治疗哺乳动物患者的疾病的方法,其包括分离如上所述来源于哺乳动物肾脏组织的哺乳动物肾源细胞群,遗传改变分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群,以产生治疗性基因产物,扩增培养物中遗传改变的细胞,和给予遗传改变的细胞,以在哺乳动物患者中产生所需的基因产物并减轻或消除哺乳动物患者的疾病。

[0014] 在又一方面,提供一种筛选治疗哺乳动物患者的涉及肾细胞的疾病的潜在药物候选物的方法,该方法包括以下步骤:(a) 制备来源于哺乳动物肾细胞或患者肾脏组织的分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群,所述细胞能够在培养物中自我更新和扩增,其中所述细胞群对 Oct-4、Rex-1、Pax-2、钙粘素 -11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7 或 GDF5 中至少一种的表达为阳性,并对 Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2 或 GATA-4 中至少一种的表达为阴性;(b) 在增殖条件下培养哺乳动物肾源细胞群,以获得细胞组合物,其包含具有体外自我更新和扩增的潜力或该潜力增加的细胞;(c) 使步骤(a) 或(b) 中的培养细胞接触潜在的药物候选物;和(d) 检测是否存在潜在药物候选物对细胞存活或所述细胞的形态、功能或生理特征和/或分子生物学特性的作用,由此改变细胞存活、改变细胞的形态、功能或生理特征和/或分子生物学特性的作用说明潜在药物候选物具有所述活性。在又一方面,细胞群对细胞表面标记 HLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD166 或 SSEA-4 中的至少一种为阳性,并对细胞表面标记 HLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141 或 E-钙粘素中的至少一种为阴性。

[0015] 还提供一种测定测试物影响分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群在培养物中的自我更新和扩增的毒性的方法。该方法包括以下步骤:(a) 培养来源于哺乳动物肾脏组织的分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群,所述细胞能够在培养物中自我更新和扩增,其中所述细胞群对 Oct-4、Rex-1、Pax-2、钙粘素 -11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7 或 GDF5 中至少一种的表达为阳性,并对 Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2 或 GATA-4 中至少一种的表达为阴性;(b) 使步骤(a) 中的培养细胞与测试物接触;和(c) 检测是否存在测试物对细胞存活或细胞的形态、功能或生理特征和/或分子生物学特性的作用,由此改变细胞存活、细胞的形态、功能或生理特征和/或分子生物学特性的作用说明测试物具有所述活性。在又一方面,细胞群对细胞表面标记 HLA I、CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD166 或 SSEA-4 中的至少一种为阳性,并对细胞表面标记 HLA II、CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141 或 E-钙粘素中的至少一种为阴性。发明详述概述

[0016] 本发明提供得自哺乳动物肾脏组织的分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群。提供由哺乳动物肾脏组织分离和纯化细胞的方法。独特的哺乳动物肾源细胞群的特征在于表型特征,例如形态、生长潜力、表面标记表型、肾发育基因表达、早期发育基因表达或肾脏保护性基因表达。在哺乳动物肾源细胞群于培养物中多次传代后,表面标记和基因表达表型均被保留。

[0017] 提供分离的或纯化的哺乳动物肾源细胞群,所述细胞群能够在培养物中自我更新和扩增,其中所述细胞群对 Oct-4、Rex-1、Pax-2、钙粘素 -11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7 或 GDF5 中至少一种的表达为阳性,并对 Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2 或 GATA-4 中至少一种的表达为阴性。分离的或纯化的哺乳动物肾源细胞群是稳定的,并能够在细胞培养物中自我更新和扩增。在一个实施方案中,细胞对 Eya1、

WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性,并对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性。所述细胞群对于哺乳动物患者的同种异体移植为非免疫原性的,证据是发现分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群对细胞表面标记 HLA I 为阳性,并对细胞表面标记 HLA II、CD80 或 CD86 中的至少一种为阴性。

[0018] 哺乳动物肾源细胞群可以分泌营养因子 FGF2、HGF、TGF  $\alpha$ 、TIMP-1、TIMP-2、MMP-2 或 VEGF 中的至少一种,且不分泌营养因子 PDGF-bb 或 IL12p70 中的至少一种。所述细胞群可来源于人、灵长类动物或啮齿类动物的肾包膜下区、肾皮质或肾髓质。哺乳动物肾源细胞群可以包括肾祖细胞。肾祖细胞能够分化为不同的细胞谱系,例如脂肪细胞或成骨细胞。

[0019] 本发明的哺乳动物肾源细胞群可用于细胞疗法,该细胞疗法用于缺血性肾脏疾病的肾再生或治疗性治疗以替代哺乳动物患者由于外伤、衰老、代谢性或毒性伤害、疾病或特发性病症而损伤的肾组织、器官、组分或结构。

[0020] 要理解的是,本发明不限于具体的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,它们当然可以改变。还要理解的是,本文使用的术语仅用于描述具体实施方案,无限制意图。在本说明书和随附权利要求中使用的单数形式“一个”、“一种”、“该”或“所述”包括复数对象,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提到的“细胞”包括两种或更多种细胞的组合等。

[0021] 本文使用的术语“(大)约”在涉及可检测值如量、时间长度等时,意在包含给定值的  $\pm 20\%$  或  $\pm 10\%$ 、更优选  $\pm 5\%$ 、甚至更优选  $\pm 1\%$ 、再更优选  $\pm 0.1\%$  的变量,这些变量适于实施所公开的方法。

[0022] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有的含义与本发明所属领域的一般技术人员的通常理解相同。尽管类似于或等同于本文所述的任何方法和材料均可用于实施本发明的测试,但本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明时,使用以下的术语。

[0023] “本发明的细胞”是指哺乳动物肾源细胞群和来源于它们的细胞,包括分化细胞或去分化细胞。哺乳动物肾源细胞群可对 Oct-4、Rex-1、Pax-2、钙粘素 -11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7 或 GDF5 中至少一种的表达为阳性,并对 Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2 或 GATA-4 中至少一种的表达为阴性。

[0024] “分化”是未特化的(“未定向的”)或基本未特化的细胞获取特化细胞(例如肾细胞)特征的过程。“分化的或分化诱导的细胞”是在细胞谱系中处于更特化(“定向”)位置的细胞。术语“定向”在应用于分化过程时,是指细胞在分化途径中进入某个点,在正常环境下,该点将继续分化为特化细胞类型或细胞类型的亚型,且不能在正常环境下分化为不同的细胞类型或回复为更少分化的细胞类型。“去分化”是指在细胞谱系中细胞回复至更少特化(或定向)位置的过程。本文使用的细胞“谱系”定义了细胞的遗传性,即其来自哪种细胞及其可以产生什么细胞。细胞谱系使细胞处于发育和分化的遗传计划当中。“谱系特异性标记”是指与目标谱系细胞的表型特异性相关的特征,并可用于评价未定向细胞向目标谱系的分化。

[0025] 在广义上,“祖细胞”是能够产生比其自身更分化的子代并仍保留补充祖细胞群的能力的细胞。根据该定义,干细胞自身也是祖细胞,终末分化细胞的更直接前体也是祖细胞。在提到本发明的细胞时,如在下文更详细的描述,可使用“祖细胞”的该广义定义。在狭义上,祖细胞经常被定义为是分化途径中的中间体的细胞,即其由干细胞产生,是成熟细

胞类型或细胞类型亚型生产中的中间体。这类祖细胞一般不能自我更新。因此,如果在本文中提到的该类细胞,其将被称为“非自我更新的祖细胞”或“中间体祖细胞”或“前体细胞”。分化的细胞可来源于自身来源于多能细胞的多能细胞,诸如此类。尽管这些多能细胞中的每种均可被视为干细胞,但每种多能细胞可产生的细胞类型范围变化可相当大。某些分化的细胞还能够产生具有更大发育潜力的细胞。这些能力可为天然的,或者可在用多种因素处理时被人工诱导。“增殖”表示细胞数的增加。

[0026] 本文使用的“肾祖细胞”是这样的哺乳动物肾源细胞:其除了产生等同潜力的子细胞之外,还可以产生诸如脂肪细胞或成骨细胞的细胞,或者可以产生一种或多种类型的组织,例如肾脏组织。“肾脏或肾祖细胞”是主要起源于成人或胎儿肾脏组织的多能或多潜能细胞。这些细胞已被发现具有多能干细胞特有的特征,包括快速增殖和分化为其它细胞谱系的潜力。“多能”肾祖细胞可产生多个细胞谱系,例如肾细胞谱系、脂肪细胞谱系或成骨细胞谱系。肾祖细胞表现出早期发育基因标记、肾脏发育基因标记、后肾间充质基因标记和促进后肾间充质存活的基因的基因表达谱。例如,肾祖细胞表现出对包括但不限于 Oct-4 和 Rex-1 的基因表达呈阳性并对包括但不限于 Sox2、FGF4、hTERT 和 Wnt-4 的基因表达呈阴性的基因表达谱。

[0027] 分离或纯化的哺乳动物肾源细胞群是稳定的,并能够在细胞培养物中自我更新和扩展。哺乳动物肾源细胞群已被表型鉴定为这样的细胞:其对 Oct-4、Rex-1、Pax-2、钙粘素-11、FoxD1、WT1、Eya1、HNF3B、CXC-R4、Sox-17、EpoR、BMP2、BMP7 或 GDF5 中至少一种的表达为阳性,并对 Sox2、FGF4、hTert、Wnt-4、SIX2 或 GATA-4 中至少一种的表达为阴性。在又一方面,哺乳动物肾源细胞群已被鉴定为对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性,并对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性。

[0028] “组织”是指一群或一层类似特化的细胞,它们一起实施某些特化功能。“器官”是指两个或更多个邻接的组织层,所述组织层保持某些形式的细胞-细胞和/或细胞-基质间的相互作用,以形成微结构。

[0029] “肾脏”是指腹部的一对器官之一。肾脏清除血液中的废物(作为尿),产生促红细胞生成素来刺激红细胞产生,并在血压调节中起作用。肾脏用于保持适宜的水和电解质平衡、调节酸-碱浓度和过滤血液的代谢废物,然后将其作为尿排泄。

[0030] “原初培养物”是指多种细胞的混合细胞群,其允许分离自组织的许多不同细胞类型相互作用。词语“原初”采取其在组织培养领域的常用含义。“能够在培养基物中自我更新和扩增”是指这样的哺乳动物肾源细胞群:其在细胞培养物中生长和分裂,并依据细胞标记和母细胞到子细胞的营养因子分泌的检测,保持基本相同的表型。在哺乳动物肾源细胞群复制过程中的某些时间点,表型可变为更特化或分化的肾源细胞状态。

[0031] 还可以在促进细胞增殖和分化的条件下,在给予患者之前培养本发明的哺乳动物肾源细胞群。这些条件包括培养细胞,以允许在体外增殖和汇合,在该时刻细胞可被制备形成聚集体或聚簇,并分泌 GDF5、BMP 或表达 BMP 或 EPO 受体。

[0032] 使用多个术语描述培养物中的细胞。“细胞培养物”一般是指取自活体生物并在受控条件下(例如“在培养物中”)生长的细胞。“原初细胞培养物”是直接取自生物体并在首次传代培养前的细胞、组织或器官的培养物。当细胞在有利于细胞生长和/或分裂的条

件下处于生长培养基中时,它们在培养物中“扩增”,产生更大的细胞群。当细胞在培养物中扩增时,细胞增殖速率有时依据细胞数倍增所需的时间量来检测。这被称为“倍增时间”。

[0033] “细胞组合物”是指细胞制备物,该制备物除了细胞之外,还可以包括非细胞组分,例如细胞培养基,如蛋白、氨基酸、核酸、核苷酸、辅酶、抗氧化剂、金属等。而且,细胞组合物可具有这样的组分:其不影响细胞组分的生长或活力,但用于以特定形式提供细胞,例如作为用于囊化的聚合基质或药物制备物。

[0034] “培养基”是本领域知晓的,也被通称为“生长培养基”,一般是指用于培养活细胞的任何物质或制备物。因此,“组织培养”是指组织(例如器官原基、肾包膜下区、肾皮质或肾髓质的移植物,或成人器官)在体外的维持或生长,以便保存其结构和功能。“细胞培养”是指细胞在体外的生长。扩增的哺乳动物肾源细胞群的组织 and 细胞培养制备物可采取多种形式。例如,“悬浮培养”是指其中细胞悬浮在适宜培养基中的同时繁殖的培养。同样,“连续流培养”是指细胞或移植物在连续流动的新鲜培养基中培养,以保持细胞生长,例如存活力。

[0035] “细胞系”是通过原初细胞培养物的一次或多次传代培养形成的细胞群。每轮传代培养被称为代。当细胞被传代培养时,它们被称为已“传代(的)”。特定细胞群或细胞系有时被称为或表征为已传代的次数。例如,已传代 10 次的培养细胞群可被称为“P10”培养物。原初培养物,即细胞由组织分离后的初次培养物,被称为 P0。在首次传代培养后,细胞被描述为次级培养物(P1 或 1 代)。在第二次传代培养后,细胞变成三级培养物(P2 或 2 代),诸如此类。本领域技术人员会理解,在传代期间可能有多次群体倍增;因此,培养物的群体倍增数通常大于代数。在传代之间的时间段内的细胞扩展(即群体倍增数)取决于许多因素,包括但不限于接种密度、底物、培养基和传代之间的时间。

[0036] “条件培养基”是其中已培养的特定细胞或细胞群并随后取出的培养基。尽管细胞在培养基中培养,但它们分泌可向其它细胞提供营养支持的细胞因子。这样的营养因子包括但不限于激素、细胞因子、胞外基质(ECM)、蛋白、抗体和颗粒。含有细胞因子的培养基为条件培养基。

[0037] 一般而言,“营养因子”被定义为促进细胞的存活、生长、增殖、成熟、分化和/或维持的物质,或者刺激增加的细胞活性的物质。本文使用的“营养支持”指促进细胞的存活、生长、增殖、成熟、分化和/或维持的能力,或者刺激增加的细胞活性的能力。本发明的哺乳动物肾源细胞群产生营养因子,其包括但不限于生长因子、细胞因子和分化因子。营养因子包括但不限于 FGF2、HGF、TGF $\alpha$ 、TIMP-1、TIMP-2、VEGF、MMP-2 或它们的组合。

[0038] “非免疫原性的”是指在大部分接受治疗的哺乳动物患者中不激发有害的免疫应答的细胞或细胞群,所述有害的免疫应答是损害哺乳动物患者健康的免疫应答或干扰受治疗的哺乳动物患者的治疗反应的免疫应答。

[0039] “基因”是指编码基因产物的核酸序列。基因任选地包含基因表达所需的序列信息(例如启动子、增强子等)。术语“基因组的”涉及生物的基因组。

[0040] “基因表达”是指基因转录为 RNA 产物,并任选地翻译为一个或多个多肽序列。

[0041] “基因表达数据”是指包括有关基因表达的不同方面的信息的一组或多组数据。数据集任选地包括关于以下的信息:靶-转录物在细胞或得到细胞的样品中的存在情况;靶转录物的相对和绝对丰度水平;多种处理诱导特定基因表达的能力;和多种处理将特定基



因的表达改变至不同水平的能力。

[0042] “基因表达谱”是指在没有（即基线或对照）或响应于选定的表达条件（例如在一个或几个时间点温育存在的标准化合物或测试化合物）的情况下多种基因的表达水平的呈现 (representation)。基因表达可表示为每个基因所转录的 mRNA 的绝对量、测试细胞的转录 mRNA 相对于对照细胞的比率等。其还指患者中单个基因和成组的各个基因的表达。

[0043] 在提到培养的脊椎动物细胞时，术语“衰老”（也称为“重复衰老”或“细胞衰老”）是指归结于有限细胞培养的特性；即，它们不能生长至超出有限的群体倍增数（有时被称为“Hayflick 限制”）。尽管细胞衰老最初使用成纤维细胞样细胞描述，但可在培养物中连续生长的大部分正常人细胞类型均经历细胞衰老。不同细胞类型的体外寿命可变，但最大寿命通常少于 100 次群体倍增（这是培养物中的所有细胞变为衰老的倍增数，由此使培养物不能分裂）。衰老不依赖于年代时间，而是通过培养物已经历的细胞分裂数或群体倍增数检测。因此，当再导入生长因子时，通过除去必需的生长因子而变得休眠的细胞能够重新开始生长和分裂，此后实现与连续生长的等同细胞相同的倍增数。类似地，当细胞在多次群体倍增后在液氮中冷冻并随后融化和培养时，它们与培养物中保持未冷冻的细胞经历基本上相同的倍增数。衰老细胞不是死亡的或垂死的细胞；它们实际上抗程序性细胞死亡（凋亡），并保持于它们的非分裂状态达 3 年之久。这些细胞非常活跃，且有代谢活性，但它们不分裂。还没有发现衰老细胞的不分裂状态可被任何生物剂、化学剂或病毒剂逆转。

[0044] “标准生长条件”是指标准大气条件，包括约 5% CO<sub>2</sub>，约 35-39℃ 的温度，更优选 37℃，以及约 100% 的相对湿度。

[0045] “ED<sub>50</sub>”是指产生其最大反应或作用的 50% 的药物剂量。

[0046] “有效量”是指产生预期结果（包括哺乳动物肾源细胞增殖）或用本发明的细胞、制备物和组合物治疗疾病或病症或在要治疗的患者中实现细胞移植的有效组分浓度，所述组分例如为生长因子、细胞因子、细胞、制备物或组合物。组分（例如生长因子、细胞因子、细胞、制备物或组合物）的有效量使细胞增殖速率和 / 或细胞分化状态产生变化。

[0047] “给予”或“给药”是指为了治疗目的而将本发明的细胞、制备物或组合物传递给患者的方法；可以许多方式给予细胞、制备物或组合物，包括胃肠外（例如静脉内和动脉内，以及其它适宜的胃肠外途径）、口服、皮下、吸入或透皮。本发明的细胞、制备物和组合物在考虑患者的临床状况、给予部位和方法、剂量、患者年龄、性别、体重和医师已知的其它因素的情况下按照良好医学规范给予。

[0048] “动物”或“哺乳动物患者”是指哺乳动物，优选人、灵长类动物、大鼠或小鼠等哺乳动物。同样，通过本发明的方法治疗的“患者”或“受试者”可指人或非人动物，对其提供采用本发明的细胞、制备物和组合物的治疗（包括预防性治疗）。为治疗特定动物如人类患者特有的那些病症或疾病状态，该术语是指该特定动物。“供体”是指捐献用于患者的肾细胞或肾脏细胞的个体（动物，包括人）。

[0049] “移植”和“植入”用于描述将本发明的细胞、制备物和组合物传递至患者的部位的方法，在该部位，预期细胞表现出有利的作用，例如修复患者组织的损伤、治疗疾病、伤害或外伤，或者由例如意外事故或其它活动引起的对器官或组织的遗传伤害或环境危害。还可以依赖于细胞迁移至机体中的适宜区域以影响移植的任何给药方式将细胞、制备物和组合物传递至机体的远方区域。

[0050] “移植物 (explant)”是指取自机体并在人工培养基中生长的一部分器官。

[0051] “离体”是指已由机体取出、在体外临时培养并返回到机体的细胞。

[0052] “基本 (上)”、“基本有效 (的)”或“基本纯 (的)”是指细胞群或方法至少 20+%、30+%、40+%、50+%、60+%、70+%、80+%、85+%、90+% 或 95+% 有效、更优选至少 98+% 有效,最优选 99+% 有效。因此,富集给定细胞群的方法富集靶细胞群的至少约 20+%、30+%、40+%、50+%、60+%、70+%、80+%、85+%、90+% 或 95%,最优选至少约 98%,最优选约 99%。在某些实施方案中,在本发明的哺乳动物肾源细胞群的富集群中的细胞基本上为哺乳动物肾源细胞,例如对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达呈阳性且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达呈阴性的细胞。

[0053] “分离 (的)”或“纯化 (的)”是指天然状态因为“通过人工”或者“人为因素的介入”而改变的,即当天然存在的任何东西已由其初始环境取出时,其被定义为分离的或分离纯化。“分离 (的)”还定义与污染物 (即不同于哺乳动物肾源细胞的物质) 分离的组合物,例如哺乳动物肾源细胞群。一方面,细胞群或组合物基本没有与其天然结合的细胞和物质。对于哺乳动物肾源细胞,“分离 (的)”或“纯化 (的)”或“基本 (上) 纯的”是指就组成总细胞群的哺乳动物肾源细胞而言为至少约 50% 纯、至少约 75% 纯、优选至少约 85% 纯、更优选至少约 90% 纯,最优选至少约 95% 纯的哺乳动物肾源细胞群。从另一方面来说,术语“基本 (上) 纯 (的)”是指本发明的哺乳动物肾源细胞群,其在随后的培养和扩增之前,在初始的未扩增和分离群中含有少于约 50%、优选少于约 30%、优选少于约 20%、更优选少于约 10%、最优选少于约 5% 的谱系定向肾细胞。细胞的群或组合物的纯度可通过本领域众所周知的适宜方法评价。

[0054] “基因疗法”是指新的遗传信息转移和稳定插入细胞中,目的是治疗性治疗疾病或障碍。依据本说明书,将基因疗法给予哺乳动物患者的多种手段对本领域技术人员是显而易见的。在本说明书中描述了基因治疗技术。将外源基因转移到增殖细胞中,以将转移的基因引入到整个细胞群中。因此,本发明的细胞和组合物可为基因转移的靶,因为它们将产生潜在表达外源基因的多种谱系。

[0055] 按照本发明方法产生的哺乳动物肾源细胞群或其前体可用于治疗肾病,例如缺血性肾损伤、肾衰竭、肾移植或肾细胞癌。细胞或由其再生的组织或功能性肾脏组织可给予患者,以治疗肾功能的急性或慢性衰退。可将功能性肾细胞或再生的肾组织植入肾细胞供体中或另一名患者中。肾细胞或其前体还可以用于构建人工肾系统,例如基于中空纤维过滤系统的系统。

[0056] 本发明的细胞、细胞制备物和细胞组合物可以用作给予哺乳动物患者的免疫原。给予按照本发明获得的哺乳动物肾源细胞群可通过多种方法实现。将细胞作为免疫原给予哺乳动物患者的方法包括但不限于免疫接种、通过直接接触 (例如通过擦洗或刮擦器官) 给予膜、给予粘膜 (例如通过气溶胶) 和口服给药。免疫接种可为被动的或主动的,可经由不同途径发生,包括腹膜内注射、皮内注射和局部注射。免疫的途径和程序依照通常建立的用于抗体刺激和生产的常规方法。可以操作哺乳动物受试者 (尤其是小鼠) 和其产生抗体的细胞,以用作生产哺乳动物杂交瘤细胞系的基础。

[0057] 本发明的哺乳动物肾源细胞群组合物可用于制备疾病的模型系统。本发明的哺乳动物肾源细胞组合物还可以用于产生化合物,包括但不限于生长因子、激素、细胞因子和免

疫刺激化合物。本发明的哺乳动物肾源细胞群分泌因子,包括但不限于 FGF2、HGF、TGF  $\alpha$ 、TIMP-1、TIMP-2、VEGF 或 MMP-2 或它们的组合,且不分泌营养因子 PDGF-bb 或 IL12p70 中的至少一种或其组合。

[0058] 一方面,本发明提供培养系统,由该系统可鉴定和分离涉及哺乳动物肾源细胞群或哺乳动物肾祖细胞的增殖或分化的基因、蛋白和其它代谢物。在本发明的培养系统中的细胞可以与其它细胞(例如分化细胞)相比较,以确定刺激哺乳动物肾源细胞或哺乳动物肾祖细胞生产的机制和化合物。

[0059] 本发明的细胞组合物可用于筛选在哺乳动物肾源细胞群中表达的基因或哺乳动物肾源细胞群分化必需的基因。可以使用的筛选方法包括代表性差异分析(RDA)或采用例如 SA-lacZ 的基因捕获。D. P. Hill 和 W. Wurst, 1993, *Methods in Enzymology*, 225 :664。基因捕获可用于诱导显性突变(例如通过缺失基因产物的特定结构域),该突变影响哺乳动物肾源细胞的分化或活性,并允许鉴定在这些细胞中表达的基因或对这些细胞分化必需的基因。

[0060] 含有增加数量的哺乳动物肾源细胞的本发明的扩展细胞制备物可用于增强患者的免疫系统。细胞制备物有利于增强或重建患者的免疫系统和/或肾脏系统。可用载体转染哺乳动物肾源细胞群,以表达免疫原性抗原,例如病毒、细菌、寄生物或癌症抗原。该转染的哺乳动物肾源细胞群可用于治疗患病的哺乳动物患者,由此减轻或消除病毒、细菌、寄生物疾病,或者减轻或消除癌症或肿瘤疾病。

[0061] 本发明进一步提供使用哺乳动物肾源细胞群表征对生物剂或药剂(或药物)的细胞响应的治疗方法,该方法包括由统计学显著的个体群分离哺乳动物肾源细胞,由统计学显著的个体群培养扩增哺乳动物肾源细胞,以建立哺乳动物肾源细胞群的多种细胞培养物,使哺乳动物肾源细胞培养物接触一种或多种生物剂或药剂,鉴定对一种或多种生物剂或药剂的一种或多种细胞响应,并比较得自统计学显著的群体的个体的哺乳动物肾源细胞培养物的一种或多种细胞响应。

[0062] 本发明还提供使用哺乳动物肾源细胞或特异性分化的哺乳动物肾源细胞群进行治疗的治疗方法,包括给予患者特异性分化的细胞。本发明进一步提供基因工程改造的哺乳动物肾源细胞选择性表达内源基因或转基因的用途,以及在体内生长的哺乳动物肾源细胞用于移植/给予入动物中以治疗疾病的用途。例如,来源于哺乳动物肾源细胞群的分化细胞可用于治疗涉及肾脏的肾小管、血管、间质或肾小球结构的疾病。例如,细胞可用于治疗肾小球基底膜的疾病,例如 Alports 综合征;肾小管转运紊乱,如 Bartter 综合征、胱氨酸尿或肾原性尿崩症;多种病因的渐进性肾脏疾病,例如糖尿病肾病或肾小球肾炎;法布瑞氏症、高草酸尿,以及用于由急性肾小管坏死加速恢复。

[0063] 来源于哺乳动物肾源细胞群的分化细胞还可以用于治疗疾病,例如急性肾衰竭、急性肾炎综合征、镇痛剂肾病、动脉粥样硬化栓塞性肾病、慢性肾衰竭、慢性肾炎、先天性肾病综合征、晚期肾病、Goodpasture 综合征、IgM 肾小球膜增殖性肾小球肾炎、间质性肾炎、肾脏癌症、肾癌、肾上腺样瘤;肾细胞腺癌、肾脏损伤、肾脏感染、肾脏伤害、肾结石、狼疮肾炎、膜增生性 GNI、膜增生性 GNII、膜性肾病、微小病变肾病、坏死性肾小球肾炎、肾胚胎瘤、肾钙质沉着症、肾原性尿崩症、肾病-IgA、肾变病(肾变病综合征)、多囊性肾脏疾病、链球菌感染后 GN、反流性肾病、肾动脉栓塞、肾动脉狭窄、肾障碍、肾乳头坏死、肾小管酸中毒

I 型、肾小管酸中毒 II 型、肾低灌注或肾静脉血栓症。

[0064] 哺乳动物肾源细胞群可用于将细胞移植到哺乳动物中,包括给予自体、同种异体或异体细胞,以恢复或修正哺乳动物的组织特异性代谢、酶、结构或其它功能。所述细胞可用于将细胞移植到哺乳动物中,引起细胞类型的体内分化,以及可用于将哺乳动物肾源细胞给予到哺乳动物中。细胞或其体外或体内的分化子代,可用于修正遗传疾病、退化性疾病或癌症疾病过程。

[0065] 哺乳动物肾源细胞群可用作治疗剂,例如帮助癌症治疗的化疗或放疗患者康复,辅助治疗自身免疫病,或诱导受体或接受者耐受性。

[0066] 本发明进一步提供基因表达谱分析哺乳动物肾源细胞群的方法,以及该基因表达谱分析在数据库中的应用。本发明还提供 使用基因表达谱分析的哺乳动物肾源细胞数据库辅助发现药物。

[0067] 本发明进一步提供使用哺乳动物肾源细胞群或由哺乳动物肾源细胞分化的细胞连同载体装置或支架一起形成人工肾脏。适宜的载体装置在本领域众所周知。例如,载体装置可为与分化的哺乳动物肾源细胞群联合使用的中空纤维型装置。本发明进一步提供使血液与分离的哺乳动物肾源细胞群离体接触从而除去患者血液中毒素的方法,所述细胞群衬在中空纤维型装置上。

[0068] 另外,在上述方法中,细胞可连同可接受的基质(例如药学上可接受的基质)一起给予。基质可为生物可降解的。基质还可以提供其它的遗传材料、细胞因子、生长因子或其它因子,以促进细胞的生长和分化。细胞还可以在给予前被囊化。囊化的细胞可包含在聚合物囊中。

[0069] 用于制备本文所述的载体装置、支架或基质的聚合物为生物可降解的和生物可相容的。生物可降解的聚合物在接触湿润的机体组织时易于分裂为小片段。然后这些片段被机体吸收,或者透过机体。更具体地说,生物降解性片段不激发长期慢性外源性机体反应,因为它们被机体吸收或由机体排除,使得没有永久性的痕量或残留片段被机体保留。

[0070] 可使用的适宜的生物相容性、生物吸收性聚合物的实例包括选自以下的聚合物:脂肪族聚酯、聚(氨基酸)、共聚(醚-酯)、聚亚烷基草酸酯、聚酰胺、聚(亚氨基碳酸酯)、聚原酸酯、聚氧杂酯(polyoxaester)、聚氨基酯、含有胺基的聚氧杂酯、聚(酐)、聚磷腈、生物分子及其混合物。对于本发明用途,脂肪族聚酯包括但不限于以下的均聚物和共聚物:丙交酯(其包括乳酸、D-、L-和内消旋丙交酯)、乙交酯(包括乙醇酸)、 $\epsilon$ -己内酯、对-二噁烷酮(1,4-二噁烷-2-酮)、环丙烷碳酸酯(1,3-二噁烷-2-酮)、环丙烷碳酸酯的烷基衍生物、 $\delta$ -戊内酯、 $\beta$ -丁内酯、 $\gamma$ -丁内酯、 $\epsilon$ -癸内酯、羟基丁酸酯(重复单元)、羟基戊酸酯(重复单元)、1,4-二氧杂环庚烷-2-酮(包括其二聚体 1,5,8,12-四氧杂环十四烷-7,14-二酮)、1,5-二氧杂环庚烷-2-酮、6,6-二甲基-1,4-二噁烷-2-酮、2,5-二酮基吗啉、新戊内酯、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -二乙基丙内酯、碳酸亚乙酯、草酸亚乙酯、3-甲基-1,4-二噁烷-2,5-二酮、3,3-二乙基-1,4-二噁烷-2,5-二酮、6,8-二氧杂双环辛-7-酮及其共混聚合物。

[0071] 在一个实施方案中,可用于本发明用途的聚合物为脂肪族聚酯,其包括但不限于以下的均聚物和共聚物:丙交酯(其包括乳酸、D-、L-和内消旋丙交酯)、乙交酯(包括乙醇酸)、 $\epsilon$ -己内酯、对-二噁烷酮(1,4-二噁烷-2-酮)、环丙烷碳酸酯(1,3-二噁烷-2-酮)、环丙烷碳酸酯的烷基衍生物、 $\delta$ -戊内酯、 $\beta$ -丁内酯、 $\gamma$ -丁内酯、 $\epsilon$ -癸内酯、羟基丁酸

酯（重复单元）、羟基戊酸酯（重复单元）、1,4- 二氧杂环庚烷 -2- 酮（包括其二聚体 1,5, 8,12- 四氧杂环十四烷 -7,14- 二酮）、1,5- 二氧杂环庚烷 -2- 酮、6,6- 二甲基 -1,4- 二噁烷 -2- 酮及其共混聚合物。在另一个实施方案中,天然聚合物也适于本发明的用途,其包括但不限于胶原、明胶、几丁质、透明质酸、弹性蛋白、纤连蛋白等。还可以使用合成和天然聚合物的组合。

[0072] 基因疗法的另一个用途允许使用通常被认为危险的高浓度药物,其通将耐药性基因转移入细胞中而提供给正常哺乳动物肾源细胞耐药性。具体地说,通过转移具有针对抗癌药的耐药性基因,例如将多种耐药性基因转移入含有哺乳动物肾源细胞的扩增细胞制备物中,有可能使用高浓度抗癌药进行治疗。

[0073] 就涉及分泌性蛋白（如激素、酶、细胞因子、生长因子等）缺陷的疾病而言,可通过使用含有哺乳动物肾源细胞群的扩增的细胞制备物,治疗涉及肾脏系统的疾病之外的疾病。将编码靶蛋白的基因转移到哺乳动物肾源细胞群中,处于适宜的启动子控制之下,可诱导和表达缺陷蛋白。可控制蛋白的表达,以获得与体内天然表达所获的活性相同的活性。

[0074] 还有可能将编码核酶的基因、反义核酸等或另一个适宜的基因插入哺乳动物肾源细胞群中,以控制特定基因产物在细胞中的 表达,或抑制对疾病的易感性。例如,可对哺乳动物肾源细胞群进行基因修饰,以表达反义核酸或核酶,它们可阻止病原体在肾脏中的生长,所述病原体包括但不限于 HIV、HTLV-I 和 HTLV-II。

[0075] 可将含有哺乳动物肾源细胞群的细胞制备物导入到为细胞移植受体的哺乳动物患者中,例如通过常规的静脉内给药。

[0076] 本发明的特征在于鉴定药物的方法,所述药物影响有哺乳动物肾源细胞形成潜力的细胞的增殖、分化或存活。这些药物的实例为小分子、抗体和胞外蛋白。可在动物中分析和评价已鉴定的药物的安全性和有效性。另一方面,本发明设想了影响有哺乳动物肾源细胞群形成潜力的细胞的增殖、分化或存活的方法,该方法使细胞与通过前述方法鉴定的一种或多种药物接触。已鉴定的药物可被配制为药物制备物。哺乳动物肾源细胞群的基因工程

[0077] 可使用众多载体中的任一种工程改造本发明的哺乳动物肾源细胞群,所述载体包括但不限于整合病毒载体,例如逆转录病毒载体或腺相关病毒载体;非整合复制载体,例如乳头瘤病毒载体、SV40 载体、腺病毒载体;或复制缺陷型病毒载体。将 DNA 导入细胞中的其它方法包括使用脂质体、电穿孔、粒子枪或直接 DNA 注射。

[0078] 优选受一种或多种适宜的表达控制元件控制的或与其有效结合的 DNA 转化或转染宿主细胞,所述元件例如为启动子或增强子序列、转录终止子、聚腺苷酸化信号,尤其是选择标记。

[0079] 在导入外源 DNA 之后,可使工程改造的细胞在富集培养基中生长,然后转换至选择培养基。在外源 DNA 中的选择标记赋予对选择的抗性,使细胞将例如质粒上的外源 DNA 稳定整合入其染色体中,并培养至形成基因座 (foci),其又可被克隆和扩增入细胞系中。该方法可有利地用于工程改造表达基因产物的细胞系。

[0080] 任何启动子均可用于驱动插入基因的表达。例如,病毒 启动子包括但不限于 CMV 启动子 / 增强子、SV40、乳头瘤病毒、EB 病毒或弹性蛋白基因启动子。优选地,用于控制目标基因表达的控制元件应允许调节基因表达,使得仅在需要时在体内合成产物。如果需要

瞬时表达,则优选在非整合载体和/或复制缺陷型载体中使用组成型启动子。或者,可在需要时用诱导型启动子驱动掺入基因的表达。

[0081] 诱导型启动子包括但不限于与金属硫蛋白和热激蛋白相关的那些启动子。已描述了表现出组织特异性的转录控制区的实例。例如,促红细胞生成素启动子是肾脏组织特异性的;大容量(2型)Na<sup>+</sup>/葡萄糖协同运输基因(Sglt2),该基因是仅在肾脏的早期近端小管中表达的基因;人有机阴离子转运体3(hOAT3/SLC22A8)主要在肾脏的近端小管中表达。

[0082] 本发明的细胞可被基因工程改造,以“敲除”在植入部位促进炎症或排斥的因子的表达。下文论述了降低目标基因表达水平或目标基因产物活性水平的负调节技术。本文使用的“负调节”是指在没有调节性治疗的情况下,目标基因产物的水平和/或活性相对于该目标基因产物的水平和/或活性的下降。可使用众多技术降低或敲除哺乳动物肾源细胞的天然基因表达,所述技术包括例如使用同源重组技术通过完全失活基因(通常称为“敲除”)抑制表达。通常,编码蛋白的重要区域的外显子被正选择标记如neo中断,阻止由靶基因产生正常mRNA,并导致该基因失活。还可以通过产生部分基因缺失或通过缺失整个基因失活基因。使用具有和靶基因同源的、在基因组中离得很远的两个区域的构建体,可以缺失插入两个区域的序列(Mombaerts等人,1991,Proc. Nat. Acad. Sci. US. A. 88:3084-3087)。

[0083] 抑制靶基因表达的反义的DNA酶和核酶分子也可以按照本发明用于降低靶基因活性水平。例如,反义RNA分子抑制主要组织相容性基因复合物(HLA)的表达,已表明其对免疫应答最通用。反义RNA分子包括但不限于SiRNA寡核苷酸或产生SiRNA寡核苷酸的cDNA。更进一步,三股螺旋分子可用于降低靶基因活性水平。

[0084] 这些技术详述于LG.Davis等人(编著),1994, BasicMethods in Molecular Biology,第2版,Appleton & Lange, Norwalk, Conn.,其整体在此引入作为参考。

[0085] 一旦本发明的细胞已被基因工程改造,它们就可以直接植入患者中,以允许通过产生抗炎基因产物改善肾病症状,所述基因产物例如为对应于GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2或其它炎性细胞因子的独特型中和抗体的肽或多肽。

[0086] 或者,基因工程改造的细胞可用于在体外产生新组织,新组织然后如上文所述被植入患者中。哺乳动物肾源细胞群用于移植

[0087] 本发明的治疗方法包括将哺乳动物肾源细胞群或转分化细胞植入个体中。本发明的哺乳动物肾源细胞群,例如对Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR或Rex-1中至少一种的表达为阳性且对Sox2、FGF4、hTert或Wnt-4中至少一种的表达为阴性的细胞群,可为同种异体的或自体的,以发现对细胞表面标记HLAI为阳性且对细胞表面标记HLA II、CD80或CD86中的至少一种为阴性为证,并可以传递至需要治疗的部位或“回巢”到该部位。本发明的细胞可原位分化,或向内源细胞提供营养支持。人的适宜细胞植入剂量可以由涉及细胞活性(例如GDF5生产)或细胞密度的现有信息确定,以治疗肾脏疾病或缺血。由体外培养和体内动物实验可以定量产生的激素量,并用该量计算植入材料的适宜剂量。另外,可监测患者,以确定是否可进行额外的植入,或因此减少植入材料。

[0088] 为增强植入细胞的分化、存活或活性,可以加入其它因子,包括生长因子,如形态发生蛋白或皮质类固醇类,抗氧化剂或抗炎剂,如环孢菌素类、他汀类、雷帕霉素和p38激酶抑制剂。

[0089] 为增强移植细胞的血管形成和存活,可单独地或与内皮细胞或其前体(包括

CD34+、CD34+/CD117+ 细胞)、人脐带组织来源 的细胞、条件培养基、由细胞或细胞裂解物产生的胞外基质组合地加入血管生成因子,例如 VEGF、PDGF 或 FGF2。

[0090] 哺乳动物肾源细胞群可用于治疗导致发病或降低平均寿命的疾病或慢性病症。这些病症和疾病包括但不限于急性肾衰竭、急性肾脏综合征、镇痛剂肾病、镇痛剂肾病、动脉粥样硬化栓塞性肾病、慢性肾病、慢性肾炎、先天性肾病综合征、晚期肾病、Goodpasture 综合征、IgM 肾小球膜增殖性肾小球肾炎、间质性肾炎、肾脏癌症、肾癌、肾上腺样瘤;肾细胞腺癌、肾脏损伤、肾脏感染、肾脏伤害、肾结石、狼疮肾炎、膜增生性 GN I、膜增生性 GN II、膜性肾病、微小病变肾病、坏死性肾小球肾炎、肾胚胎瘤、肾钙质沉着症、肾原发性尿崩症、糖尿病视网膜病、肾病-IgA、肾变病(肾变病综合征)、多囊性肾脏疾病、链球菌感染后 GN、反流性肾病、肾动脉栓塞、肾动脉狭窄、肾障碍、肾乳头坏死、肾小管酸中毒 I 型、肾小管酸中毒 II 型、肾低灌注或肾静脉血栓症。临床管理策略经常集中于预防进一步的损伤或伤害,而不是置换或修复受损组织(例如肾小管、肾小球、神经元、胶质细胞、心肌)。临床管理策略包括用外源类固醇类和合成的非细胞药物治疗,成功的程度不定,可取决于类固醇或合成药物的持续给药。

[0091] 可将一种或多种其它组分加入移植的细胞,包括选定的胞外基质组分,例如本领域已知的一种或多种类型的胶原,和/或生长因子、富血小板血浆和药物。可有效地掺入细胞制剂中的生长因子包括一种或多种本领域已知的或者在以后鉴定的组织生长因子,包括但不限于 BMP、GDF、IGF-I 和 -II 或生长激素。或者,本发明的细胞可被基因工程改造,以表达和生产营养因子。有关基因工程改造本发明细胞的细节在本文的公开内容中提供,是本领域技术人员已知的。可有效地掺入细胞制剂中的药物包括抗炎化合物、促血管生成化合物、抗凋亡化合物以及局部麻醉剂。用于移植的哺乳动物肾源细胞群的囊化

[0092] 哺乳动物肾源细胞群,例如对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达呈阳性且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达呈阴性的细胞群,可为同种异体的或自体的,以发现细胞群对细胞表面标记 HLA I 为阳性且对细胞表面标记 HLA II、CD80 或 CD86 中的至少一种为阴性为证,可不被免疫系统识别,或者可降低在混合淋巴细胞反应中观察到的免疫应答。

[0093] 优选分化细胞来源于需要治疗的患者,以避免免疫排斥。然而,在没有可利用的自体细胞的情况下,将分化细胞包裹在囊泡中可能有用,所述囊泡能透过细胞需要的营养物和氧以及细胞分泌的治疗因子,例如激素或 BMP-7、GDF5,但不能透过免疫体液因子和细胞。优选地,包裹材料是低变应原的,容易并稳定地位于靶组织,提供对植入结构的附加保护。

[0094] 还可以按照本领域已知的任何方法,通过遗传修饰分化细胞,提供对免疫排斥的防护。可以使用例如在美国专利号 5,286,632、5,320,962、5,342,761 以及 WO 90/11354、WO 92/03917、WO 93/04169 和 WO 95/17911 中公开的方法,产生自身抗体和 CTL 抗性细胞。或者,在存在自身抗体或 IDD 相关的 CTL 或用 IDD 特异性自身抗原活化的 CTL 的情况下,通过培养这些细胞,实现抗性转分化细胞的选择。作为这些技术的结果,产生了对抗体或 T-淋巴细胞依赖性机制破坏的抗性增加的细胞。这类细胞可被植入到如本文公开的适宜宿主的适宜组织中,使对自身免疫过程的破坏的抗性增加。

[0095] 同样,任选地通过重复过程可以修饰分化细胞的人白细胞抗原(HLA)谱,其中分化细胞接触正常的同种异体淋巴细胞,并选择存活细胞。或者,使用定向诱变方法消除分化

细胞表面的 HLA 标记,将由此产生的修饰的分化细胞植入需要此植入的受体哺乳动物中。

[0096] 在具体的实例中,使用携带新霉素抗性基因 neo 的腺相关病毒 (AAV) 载体系统。AAV 可用于转染真核细胞 (Laface 等人 (1988) *Virology* 162:483)。另外,使用携带腐草霉素抗性基因的 pBABE-bleo 穿梭载体系统 (Morgenstern 等人 (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:3587)。该穿梭载体可用于以如本文所述的有用基因转化人细胞。哺乳动物肾源细胞群的冷冻保存和建库

[0097] 本发明的哺乳动物肾源细胞群可被冷冻保存,并保持或储存在“细胞库”中。可按照已知方法进行本发明细胞的冷冻保存。例如但非限制性的,细胞可以例如约  $0.5-10 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度悬浮在“冷冻培养基”中,例如还含有 0-95% FBS 和 0-10% 二甲基亚砜 (DMSO) 冷冻保护剂、有或没有 5-10% 甘油的培养基。或者,可以使用其它冷冻保护剂,例如碳水化合物,包括但不限于葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和海藻糖。将细胞分配入玻璃或塑料安瓿或其它容器中,然后将其密封,并转移至控速冰箱的冷冻室。最佳冷冻速度可凭经验确定。可以使用可编程的控速冰箱,其例如可通过溶解热产生  $-1$  至  $-10^\circ\text{C}$  / 分钟的温度改变。一旦安瓿达到  $-180^\circ\text{C}$ ,就将它们转移至液氮储存区域。冷冻保存的细胞可储存数年,但应至少每 5 年检查它们 1 次,以便保持存活力。

[0098] 冷冻保存的本发明细胞构成了细胞库,部分可通过融化取出部分,然后根据需要使用。融化一般应当快速进行,例如将安瓿由液氮转移至  $37^\circ\text{C}$  水浴。安瓿的融化内容物应在无菌环境下立即转移至含有适宜培养基的培养容器,所述培养基例如为用 10% FBS 条件化的 DMEM。使用哺乳动物肾源细胞群体外筛选药物效力或毒性

[0099] 本发明的哺乳动物肾源细胞群可用于在体外筛选各种各样的化合物的药物、生长因子 / 调节因子和抗炎剂的有效性和细胞 毒性。为此,在体外保持本发明的细胞或上述组织培养物,并接触测试的化合物。细胞毒性化合物的活性可通过其损伤或杀死培养物中的细胞的能力进行检测。这可易于通过生命染色技术来评价。生长因子 / 调节因子的作用通过在体外分析活细胞数来评价,例如通过全细胞计数和差异细胞计数。这可使用标准细胞学和 / 或组织学技术完成,包括使用应用限定型特异性细胞抗原的抗体的免疫细胞化学技术。可以评价多种药物对在悬浮培养物或上述三维系统中的本发明细胞的作用。

[0100] 本发明的细胞和组织可以用作研究生理学或病理学状况的模型系统。例如,本发明的哺乳动物肾源细胞群可用于研究疾病状态,例如急性肾衰竭、慢性肾衰竭、肾脏癌症、肾癌、肾上腺样瘤;肾细胞腺癌、肾脏损伤、肾脏感染、肾脏伤害、肾结石、狼疮肾炎、多囊性肾脏疾病或肾静脉血栓症。

[0101] 本发明的细胞和组织还可以用于研究细胞因子、生长因子 (例如 EPO) 和炎性介导物 (例如 IL-1、TNF 和前列腺素) 的作用机制。另外,可筛选对特定患者最有效的那些细胞毒性剂和 / 或药物,例如逆转、降低或阻止肾脏疾病或肾缺血的那些,或者增强肾脏组织的平衡生长的那些。证实在体外有效的药物然后可用于治疗性治疗患者。哺乳动物肾源细胞群生产生物分子的用途

[0102] 在进一步的实施方案中,本发明的哺乳动物肾源细胞群可在体外培养,从而以高得率生产生物产物。例如,这样的细胞天然生产特定的目标生物产物 (例如生长因子、调节因子或肽激素),或者被基因工程改造为生产生物产物,可使用例如三维细胞培养系统克隆扩增。如果细胞将生物产物分泌入营养培养基中,则易于使用标准分离技术,例如差异蛋白



沉淀、离子交换层析、凝胶过滤层析、电泳和 HPLC 等等,由用过的培养基或条件培养基分离产物。“生物反应器”可用于在体外利用流加方法来饲养例如三维培养物。

[0103] 基本上,随着新鲜培养基通过三维培养物,生物产物从培养物洗出,然后可以如上由流出物分离。

[0104] 或者,目标生物产物可保留在细胞中,因此,其收集可能需要裂解细胞。然后可使用任一种或多种以上列出的技术纯化生物产物。给药方法

[0105] 在本文描述的方法中,哺乳动物肾源细胞群(例如对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性的细胞)的治疗有效量,可在患者安全接受的最大细胞数至在缺血肾脏组织中诱导新血管形成或增加向缺血肾脏组织的血流或修复或再生肾包膜下区、肾皮质或肾髓质组织所需的最小细胞数的范围内。一般而言,哺乳动物肾源细胞群的治疗有效量为至少  $1 \times 10^4$  个/kg 患者体重,最普遍的是,不需要大于  $1 \times 10^7$  个每种类型的细胞/kg。尽管优选哺乳动物肾源细胞群是自体的或与患者 HLA 相匹配,但哺乳动物肾源细胞群可分离自其它个体或物种或基因工程改造的近交供体品系,或分离自体外细胞培养物。分离的或纯化的哺乳动物肾源细胞群对细胞表面标记 HLA I 是阳性的,并对细胞表面标记 HLA II、CD80 或 CD86 是阴性的。细胞群对哺乳动物患者的异体移植是非免疫原性的。

[0106] 治疗有效量的哺乳动物肾源细胞群可悬浮在药学上可接受的载体或赋形剂中。这样的载体包括但不限于基础培养基加 1% 血清白蛋白、盐水、缓冲盐水、葡聚糖、水、胶原蛋白、藻酸盐、透明质酸、纤维蛋白胶、聚乙二醇、聚乙烯醇、羧甲基纤维素及其组合。制剂应适合给药模式。因此,本发明提供人肾脏组织生产的人肾源细胞群用于制备治疗患者缺血性肾脏组织的药物的用途,所述细胞群例如为对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性的细胞。在某些实施方案中,所述药物进一步包含重组多肽,例如生长因子、趋化因子或细胞因子。在其它实施方案中,所述药物包含人肾源细胞群。可以使用提供给本文所述方法的任何变化分离、衍生或富集用于制备所述药物的细胞。

[0107] 按照常规程序将哺乳动物肾源细胞制备物或组合物配制为适于对人类静脉内给药的药物组合物。通常,用于静脉内给药、动脉内给药或肾包膜内给药的组合物为在无茵等渗水性缓冲液中的溶液。在必要时,组合物还可以包括局部麻醉剂,以缓解注射部位的任何疼痛。一般而言,成分单独地或混合在一起以单位剂型提供,例如作为在密封容器中的冷冻保存浓缩物,所述容器例如为标示活性成分量的安瓿。当组合物通过输注给予时,其可分配在含有无茵药用级水或盐水的输液瓶中。当组合物通过注射给药时,可提供一安瓿无茵注射用水或盐水,以便所述成分可在给药前混合。

[0108] 药学上可接受的载体部分由要给予的具体组合物以及用于给予组合物的具体方法决定。因此,存在各种各样的适宜的药物组合物制剂(参见例如 Alfonso R Gennaro(编著),Remington:The Science and Practice of Pharmacy,以前为 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 20 版,Lippincott,Williams & Wilkins,2003,其整体在此引入作为参考)。药物组合物一般被配制为无茵的、基本上等渗的,且与美国食品和药品监督管理局的所有药品生产质量管理规范(GMP)的规定完全相适。

[0109] 依据本说明书,将细胞给予患者的多种方法对本领域技术人员是显而易见的。这

些方法包括将细胞注射入患者的靶部位。可将细胞插入传递装置中,该装置有利于通过注射入或植入患者中导入。这类传递装置可以包括用于将细胞或流体注射入受体患者机体中的管,例如导管。在优选的实施方案中,所述管另外具有针头,例如注射器,通过其可将本发明的细胞导入到患者的目标位置。在优选的实施方案中,哺乳动物肾源细胞群配制用于经导管给予到血管中(其中术语“导管”意在包括多种管样系统中的任一种,用于将物质传递至血管)。或者,可将细胞插入支架中或插在支架上,所述支架包括但不限于纺织物,如梭织、针织、编织、筛,和非纺织物、打孔胶片、海绵和泡沫材料,以及珠,例如固体或多孔珠、微粒、纳粒等。细胞可被制备用于以多种不同形式传递。例如,细胞可以悬浮在溶液或凝胶中。细胞可与本发明的细胞在其中保持存活的药学上可接受的载体或稀释剂混合。药学上可接受的载体和稀释剂包括盐水、水性缓冲溶液、溶剂和/或分散介质。这些载体和稀释剂的用途在本领域众所周知。溶液优选为无菌的和液体,并经常是等渗的。优选地,溶液在生产 and 储存条件下是稳定的,并通过使用例如尼泊金酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等防腐,以对抗微生物如细菌和真菌的污染作用。

[0110] 给予哺乳动物肾源细胞群(例如对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性的细胞)的方式包括但不限于系统、肾脏内、静脉内或动脉内注射和直接注射入组织中的预期作用部位。制备物可通过任何常规途径给予,例如通过输注或浓注,并可以与其它生物活性药物一起给予。给药优选是系统的。最优选地,给药部位接近或最接近预期作用部位。就患者罹患全身缺血时的情况而言,优选系统给药,例如静脉内给药。无意受机制束缚,含有哺乳动物肾源细胞群的组合物在给予时,响应于由于伤害产生的趋化因子而迁移或归巢至缺血组织,例如肾脏中的缺血组织。可通过本发明方法治疗的缺血组织包括但不限于肾缺血。

[0111] 本文描述的方法提供了连同细胞给予一起给予患者的重组多肽或药物。多肽或药物可在给予细胞之前、同时或之后给予患者。在一个优选的实施方案中,重组多肽或药物促进血管新生、血管发生或这二者。在另一个实施方案中,重组多肽或药物促进哺乳动物肾源细胞群的增殖或分化。在一个实施方案中,重组多肽为 VEGF、FGF2、SDF、CXCR-4 或 CXCR-5,或其保留了对缺血组织的治疗活性的片段。

[0112] 具体地说,本发明的方法可用于治疗血管发生,以便治疗人肾脏缺血。按照本发明的方法给予哺乳动物肾源细胞群,例如对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性的细胞,可以用作唯一的治疗或用作手术和/或医学治疗形式的附加。例如,本文描述的用于治疗肾缺血的方法可以与肾癌、肾感染、肾损伤、肾移植或肾结石的治疗联合使用。本文描述的方法尤其可用于在手术治疗后缺血区域的血管再发生不完全并因此具有缺血但存活的肾脏组织区域的患者。可由依照本发明方法的治疗性血管生成显著获益的患者是存活肾脏组织的大部分区域受到受损的灌注危害的那些患者,所述灌注由血管再造技术的较差目标的血管提供。

[0113] 哺乳动物肾源细胞群(例如对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性的细胞)的治疗有效量,是患者安全接受的最大细胞数。因为优选的注射途径是肾脏内,所以

最大剂量应考虑要输注细胞的容器大小,使得该容器不变成阻塞的或塞紧的。在缺血肾脏组织中诱导新血管形成必需的最小细胞数可通过剂量增加研究凭经验确定,无过度不当实验。例如,这种剂量增加可以约  $10^4$  个哺乳动物肾源细胞/kg 体重开始。

[0114] 本发明的一个方面进一步提供一种药制剂,其包含 (a) 哺乳动物肾源细胞群,例如对 Eya1、WT1、FoxD1、BMP7、BMP2、GDF5、EpoR 或 Rex-1 中至少一种的表达为阳性且对 Sox2、FGF4、hTert 或 Wnt-4 中至少一种的表达为阴性的细胞,和药学上可接受的载体。在某些实施方案中,所述制剂包含  $10^4$  至  $10^9$  个哺乳动物肾源细胞。在又一个实施方案中,所述制剂准备通过导管给药。

[0115] 在适宜的情况下和除非另有说明,否则将使用常规的细胞生物学技术、细胞培养技术、分子生物学技术、转基因生物学技术、微生物学技术、病毒学技术、重组 DNA 技术和免疫学技术实施本发明,这些技术在本领域的知识范围内。这些技术在文献中描述。参见例如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版, Sambrook 和 Russell 编著 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001); 论文 Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Using Antibodies, 第 2 版, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Current Protocols in Cell Biology, 由 Bonifacino, Dasso, Lippincott-Schwartz, Harford 和 Yamada 编著, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999。

[0116] 依据本文公开内容,其它实施方案和用途对本领域技术人员是显而易见的。示例性实施方案实施例 1 分离人肾源细胞

[0117] 正常的人肾脏得自国家疾病研究交流会 (NDRI, Philadelphia, PA)。每个肾脏均用 Dulbecco 改良 Eagles 培养基 (DMEM- 低葡萄糖, Invitrogen, Carlsbad, CA) 或磷酸缓冲盐水 (PBS, Invitrogen) 洗涤,以便除去血液和碎片。由肾脏的外部皮质区、内部髓质区和包膜下区解离组织。然后将组织在组织培养板中机械解离,直至组织被切碎成细浆。然后将组织转移至 50ml 圆锥管。然后将组织在符合药品生产质量管理规范 (GMP) 的酶混合物 (含有 0.25 单位 PZ 活性/ml 胶原酶 (NB6, N0002779, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany)、2.5 单位/ml 分散酶 (分散酶 II 165 859, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)、1 单位/ml 透明质酸酶 (Vitrax, ISTA Pharmaceuticals, Irvine, Ca)) 或非 GMP 级酶混合物 (含有 500 单位/ml 胶原酶 (Sigma, St Louis, MO)、50 单位/ml 分散酶 (Invitrogen) 和 5 单位/ml 透明质酸酶 (Sigma)) 中消化。还用 50 单位/ml 分散酶分离肾源细胞。将酶混合物与肾上皮生长培养基 (REGM) (Cambrex, Walkersville, MD) 或间充质干细胞生长培养基 (MSCGM) (Cambrex) 组合。将含有组织、培养基和消化酶的圆锥管于 37°C 在轨道摇床中以 225rpm 温育 1 小时。

[0118] 将消化物以 150xg 离心 5 分钟,吸出上清液。将产生的细胞沉淀重悬浮在 20ml REGM 或 MSCGM 中。细胞悬浮液通过 40-微米尼龙 BD FALCON 细胞滤网 (BD Biosciences, San Jose, CA) 过滤。将滤过液重悬浮在培养基 (总体积 50ml) 中,并以 150xg 离心 5 分钟。吸出上清液,将细胞沉淀重悬浮在 50ml 新鲜培养基中。再重复该过程 2 次。

[0119] 在最终离心后,吸出上清液,将细胞沉淀重悬浮在 5ml 新鲜培养基中。使用 Guava 仪器 (Guava Technologies, Hayward, CA) 测定存活细胞数。然后将细胞以 5000 个细胞/cm<sup>2</sup> 的接种密度铺在 2% 明胶或层粘连蛋白包被的组织培养烧瓶上,并在低氧 (缺氧) 或正

常（含氧量正常）气氛下培养。表 1 显示了用于分离肾源细胞群的供体信息和生长条件。为获得单细胞来源的肾脏细胞克隆，实施有限稀释技术。总之，使用 24 种不同条件由 4 具 39、46、21 和 10 岁的不同尸体供体分离细胞。实施例 2 肾源细胞形态

[0120] 在分离后 7 天，通过光学显微镜评价肾源细胞群，并观测细胞的形态学特征。所有的分离条件都一致地产生具有上皮形态的细胞。（表 1）表 1：用于建立肾源细胞培养物的条件。非-GMP 级酶 (A)。GMP 级酶 (B)。分散酶 (C)。以岁数表示的供体年龄（年龄）。培养物生长的气氛 (Atm)。正常氧含量 (N)。低氧 (H)。

| 分离株 | 年龄 | 供体性别 | 组织来源 | 酶 | 培养基   | 基质    | Atm | 形态 |
|-----|----|------|------|---|-------|-------|-----|----|
| 1   | 39 | 男    | 皮质   | A | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 2   | 39 | 男    | 髓质   | A | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 3   | 39 | 男    | 皮质   | A | MSCGM | 明胶    | N   | 上皮 |
| 4   | 39 | 男    | 髓质   | A | MSCGM | 明胶    | N   | 上皮 |
| 5   | 39 | 男    | 皮质   | A | REGM  | 明胶    | H   | 上皮 |
| 6   | 39 | 男    | 髓质   | A | REGM  | 明胶    | H   | 上皮 |
| 7   | 39 | 男    | 皮质   | A | MSCGM | 明胶    | H   | 上皮 |
| 8   | 39 | 男    | 髓质   | A | MSCGM | 明胶    | H   | 上皮 |
| 9   | 39 | 男    | 皮质   | A | REGM  | 层粘连蛋白 | N   | 上皮 |
| 10  | 39 | 男    | 髓质   | A | REGM  | 层粘连蛋白 | N   | 上皮 |
| 11  | 39 | 男    | 皮质   | A | MSCGM | 层粘连蛋白 | N   | 上皮 |
| 12  | 39 | 男    | 髓质   | A | MSCGM | 层粘连蛋白 | N   | 上皮 |
| 13  | 39 | 男    | 皮质   | A | REGM  | 层粘连蛋白 | H   | 上皮 |
| 14  | 39 | 男    | 髓质   | A | REGM  | 层粘连蛋白 | H   | 上皮 |
| 15  | 39 | 男    | 皮质   | A | MSCGM | 层粘连蛋白 | H   | 上皮 |
| 16  | 39 | 男    | 髓质   | A | MSCGM | 层粘连蛋白 | H   | 上皮 |
| 17  | 46 | 男    | 包膜下  | B | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 18  | 46 | 男    | 皮质   | B | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 19  | 46 | 男    | 皮质   | A | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 20  | 46 | 男    | 髓质   | B | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 21  | 46 | 男    | 髓质   | A | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 22  | 21 | 男    | 包膜下  | A | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 23  | 21 | 男    | 皮质   | A | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |
| 24  | 10 | 女    | 皮质   | C | REGM  | 明胶    | N   | 上皮 |

[0121] 该数据表明,肾源细胞可以由任何年龄或性别的供体分离,以及使用多种生长培

培养基配制物或培养条件分离。分离程序的简易性和一致性表明,肾源细胞是用于基于细胞的疗法的有价值的细胞来源。实施例 3 肾源细胞生长潜力

[0122] 肾源细胞可以在培养物中大量增殖,并能够在短时间内产生大量的细胞。这是开发同种异体细胞疗法的关键。

[0123] 将肾源细胞以 5,000 个细胞/cm<sup>2</sup> 铺在 T75 烧瓶上的 REGM 或 MSCGM 中,并于 37℃ 在 5%二氧化碳中培养。细胞每 2-5 天传代 1 次。在每次传代时,计数细胞,并使用 Guava 仪器 (Guava Technologies, Hayward, CA) 检测存活力。细胞群持续传代几周,直至达到衰老。当细胞在研究时间间隔当中不能达到 1 次以上的群体倍增时确定衰老。然后计算群体倍增 [ $\ln(\text{最终的细胞得率} / \text{接种的初始细胞数量}) / \ln 2$ ]。

[0124] 对于染色体组型分析,将得自分离株 22 和 23 的第 4 代和第 10 代肾源细胞铺入 T25 烧瓶,并使其附着过夜。然后用 REGM 装填烧瓶,并进行染色体组型分析。

[0125] 表 2 是所测试的分离株的生长数据的概述。就供体年龄、组织源或用于分离细胞的酶而言,对细胞生长特征没有显著影响。

[0126] 对第 4 代和第 10 代的分离株 22 和 23 进行染色体组型分析。二者均显示出处于第 4 代和第 10 代的正常染色体组型。表 2:生长潜力数据的汇总。群体倍增 (PD)。参考表 1 的分离株编号交叉引用。

| 分离株 | 至衰老的天数 | 代数 | PD   | 存活力 (%) |
|-----|--------|----|------|---------|
| 1   | 54     | 12 | 31.2 | 98      |
| 2   | 54     | 12 | 26.8 | 98      |
| 17  | 51     | 11 | 30.2 | 98      |
| 18  | 48     | 10 | 26.8 | 97      |
| 19  | 42     | 9  | 24.9 | 97      |
| 20  | 48     | 10 | 31.0 | 98      |
| 21  | 48     | 10 | 29.0 | 98      |
| 22  | 47     | 16 | 28.7 | 97      |
| 23  | 47     | 16 | 27.9 | 97      |

[0127] 平均而言,衰老时的群体倍增 (PD) 为 28.5,而平均存活力为 97.6%。

[0128] 总之,肾源细胞在培养物中具有强壮的生长潜力。这些数据可用于估计由 1 个完整人肾脏产生的细胞总数。如果所有的肾脏组织都被处理,且产生的细胞培养达 31 次群体倍增,则 1 个完整人肾脏应产生估计  $1.89 \times 10^{16}$  个总细胞。因此,考虑到细胞的 1 个治疗剂量为  $1 \times 10^8$  个细胞/人,分离自单个肾脏的肾源细胞将足以治疗 1.89 亿名患者。最后,这些细胞是用于基于同种异体的细胞疗法的高度可扩增的细胞来源。实施例 4 肾源细胞表面标记表型

[0129] 对肾源细胞进行流式细胞术分析,以确定表面标记表型。得自实施例 1 的 9 个分离株的细胞在 T75 烧瓶上的 REGM 中于 37℃ 和 5%二氧化碳中被扩增至第 4 代和第 10 代。用 PBS 洗涤粘附细胞,并用 TrypLE Select (Gibco, Grand Island, NY) 解离。收获、离心细胞,并以  $2 \times 10^5$  个细胞/ml 的浓度重悬浮在 3% (v/v) FBS 的 PBS 溶液中。将特异性抗体加至 100  $\mu$ l 细胞悬浮液,并将混合物在黑暗中于 4℃ 温育 30-45 分钟。在温育后,用 PBS 洗涤细胞,并离心以除去过量的抗体。将细胞重悬浮在 500  $\mu$ l PBS 中,并通过流式细胞术分析。用 Guava 设备仪器 (Guava Technologies, Hayward, CA) 进行流式细胞术分析。用于表征表面标记表型的抗体示于表 3。

表 3:用于表征肾源细胞的细胞表面标记表型的抗体。

| 抗体       | 生产商               | 目录号         |
|----------|-------------------|-------------|
| CD34     | BD Pharmingen     | 555821      |
| CD44     | BD Pharmingen     | 555478      |
| CD45R    | BD Pharmingen     | 555489      |
| CD117    | BD Pharmingen     | 340529      |
| CD141    | BD Pharmingen     | 559781      |
| CD31     | BD Pharmingen     | 555446      |
| CD49c    | BD Pharmingen     | 556025      |
| CD73     | BD Pharmingen     | 550257      |
| CD90     | BD Pharmingen     | 555596      |
| HLA-I    | BD Pharmingen     | 555553      |
| HLA-II   | BD Pharmingen     | 555558      |
| CD133    | Miltenyi Biotech  | 120-001-243 |
| SSEA4    | R&D Systems       | FAB1435P    |
| CD105    | SantaCruz Biotech | SC-21787    |
| CD104    | BD Pharmingen     | 555720      |
| CD166    | BD Pharmingen     | 559263      |
| CD29     | BD Pharmingen     | 555442      |
| CD24     | BD Pharmingen     | 555428      |
| CD56     | AbCAM             | MEM188      |
| CD138    | BD Pharmingen     | 550805      |
| CD80     | BD Pharmingen     | 557226      |
| CD86     | BD Pharmingen     | 555659      |
| E-钙粘素    | BD Pharmingen     | 612130      |
| IgG-FITC | BD Pharmingen     | 555748      |
| IgG-PE   | BD Pharmingen     | 555749      |

[0130] 表 4 显示了所有表面标记表型数据的汇总。所测试的所有分离株都显示出对 CD24、CD29、CD44、CD49c、CD73、CD90、CD166、SSEA-4 和 HLA I 正染色和对 CD31、CD34、CD45、CD56、CD80、CD86、CD104、CD105、CD117、CD133、CD138、CD141、E-钙粘素和 HLA II 负染色。另外,所分析的所有分离株都扩增多代(10代),仍保留其表面标记表型。

[0131] 这些细胞表达 HLA I,但不表达 HLA II、CD80 或 CD86。这些细胞表达特征反映出细胞逃避宿主免疫系统的能力。这些数据证实,肾源细胞是非免疫原性的,可不需要组织分

型或免疫抑制而给予患者。

[0132] 总之,这些数据证实,可在多个条件(表1)下由多个供体分离肾源细胞,但仍保留其表面标记表型。另外,它们表达推定的祖细胞标记,如CD24和SSEA-4,但不表达成熟的谱系-定向标记,如E-钙粘素。最后,肾源细胞是非免疫原性的,因此是用于同种异体细胞治疗的有吸引力的细胞来源。表4:表面标记分析的汇总。未测定(ND)。正染色(+)。负染色(-)。分离株

|       |                | 1  | 2  | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|-------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 表面标记  | 又名             |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| CD29  | B1-整联蛋白        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| CD44  | HCAM           | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| CD49C | a3-整联蛋白        | ND | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| CD166 | ALCAM          | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| CD24  | 热激抗原-1         | ND | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| CD73  | SH3            | ND | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| CD90  | Thy-1          | ND | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| SSEA4 | 无              | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| CD31  | PECAM-1        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD34  | gp105          | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD45  | Ly5            | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD56  | NCAM           | ND | ND | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD104 | b4-整联蛋白        | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD138 | Syndecan-1     | ND | ND | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD141 | 血栓调节蛋白         | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| E-钙粘素 | 无              | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD105 | 内皮糖蛋白          | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD117 | c-Kit          | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD133 | AC133          | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| CD80  | B7-1           | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | -  | -  | -  |
| CD86  | B7-2           | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | -  | -  | -  |
| HLA I | MHC-a,b,c      | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | +  | +  | +  |
| HLAII | MHC-DP ,DQ, DR | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | -  | -  | -  |



### 实施例 5 肾源细胞基因表达

[0133] 使用 RNA 提取试剂盒 (RNeasy 小型试剂盒 ;Qiagen, Valencia, CA) 由分离株 1、2 和 17-23 的细胞提取 RNA。用 50  $\mu$ l DEPC 处理水洗脱 RNA,并储存于 -80℃。使用随机六聚体和 TaqMan 逆转录试剂 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 于 25℃、10 分钟 ;37℃、60 分钟和 95℃、10 分钟逆转录 RNA。样品储存于 -20℃。使用在表 5 中描述的引物,通过常规 PCR(聚合酶链式反应)研究选定基因。使用 RT<sup>2</sup> PCR 引物组 (SuperArray Biosciences Corp, Frederick MD) 对 cDNA 样品进行 PCR。

表 5:用于研究的引物

| 基因             | SuperArray 目录号 |
|----------------|----------------|
| Oct-4          | PPH02394A      |
| Rex 1          | PPH02395A      |
| Sox2           | PPH02471A      |
| 人 TERT (hTERT) | PPH00995A      |
| FGF4           | PPH00356A      |
| Pax 2          | PPH06881A      |
| 钙粘素-11         | PPH00667A      |
| WT1            | PPH00254A      |
| FOXD1          | PPH01990A      |
| WNT4           | PPH02445A      |
| Epo            | PPH01338A      |
| EpoR           | PPH02642A      |
| Eya1           | PPH10542A      |
| HNF3B          | PPH00976A      |
| Sox17          | PPH02451A      |
| Gata4          | PPH010860A     |
| Six2           | PPH10860A      |
| CXCR4          | PPH00621A      |
| BMP-2          | PPH00549A      |
| BMP-7          | PPH00527A      |
| GDF5           | PPH01912A      |

[0134] 按照生产商的说明书将引物与 1  $\mu$ l cDNA 和 2XReactionReady™ SYBR Green PCR 主混合物 (SuperArray Biosciences) 混合,使用 ABI Prism 7000 系统 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行 PCR。热循环条件开始为 50℃、2 分钟和 95℃、10 分钟,接着 34 个循环的 95℃、15 秒和 60℃、1 分钟。对于 GAPDH,使用 AppliedBiosystems 的

GAPDH 引物 (目录号:402869)、1  $\mu$ l cDNA 溶液和 1 $\times$ AmpliTaq Gold 通用混合 PCR 反应缓冲液 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 按照生产商的说明进行 PCR。在最终的 PCR 反应中正向和反向引物的引物浓度均为 0.5  $\mu$ mol, 未加入 TaqMan 探针。样品在 2% (w/v) 琼脂糖凝胶上电泳, 并用溴化乙锭 (Sigma, St. Louis, MO) 染色。图像使用 667Universal Twinpack 胶片 (VWR International, South Plainfield, NJ) 和某一焦距的 Polaroid™ 照相机 (VWR International, South Plainfield, NJ) 捕获。对于分析的每个基因, 由凝胶切出最终的 PCR 产物, 并通过 DNA 测序证实靶序列。RT-PCR 分析

[0135] 分析的所有细胞分离株都显示出恒定和稳定的基因表达谱。对分离株 1、2 和 17-23 进行 RT-PCR 分析, 以便检测早期发育基因标记 (Oct-4、Rex-1、Sox2、FGF4、hTert)、肾脏发育基因标记 (Pax-2、WT-1、Eya-1、Wnt-4、BMP-7、钙粘素 -11、FoxD1)、后肾间充质基因标记 (Pax-2、Eya-1、WT-1、Six2 和 FoxD1) 和促进后肾间充质存活的基因 (BMP-7) 的表达。另外, 分析了其它发育基因的表达, 所述发育基因例如为内皮基因 (HNF3B、CXC-R4、Sox-17、GATA-4) 以及促进肾修复或治疗肾病有治疗价值的基因标记 (Epo、EpoR、BMP-7、BMP-2、GDF5)。

[0136] 如在表 6 中所示, 所有的分离株都显示出 Oct-4 和 Rex-1 的阳性表达以及 Sox2、FGF4、hTERT 和 Wnt-4 的阴性表达。分离株 17-23 显示出 Pax-2、WT1、钙粘素 -11 和 FoxD1 的阳性表达。分离株 22 和 23 显示出 Eya-1、Sox-17 和 CXCR-4 的阳性表达以及 GATA-4 的阴性表达。分离株 17-23 表达 EpoR, 但不表达 Epo。分离株 17-22 表达 BMP-2、BMP-7 和 GDF5。另外, 所有的分离株都可以扩展多代 (10 代), 但仍保留其基因表达表型。表 6: 基因表达分析的汇总。阳性表达 (+)。阴性表达 (-)。未确定 (ND, not determined)。在早期发育中起作用的基因 (早期发育)。在肾脏发育过程中起作用的基因 (肾脏发育)。后肾间充质标记 (Met)。内皮 (endodermal lineage) 谱系标记 (内皮)。涉及肾脏存活的基因 (肾脏保护)。涉及后肾间充质存活的基因 (存活)。

| 基因名称     | 功能        | 分离株 |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------|-----------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|          |           | 1   | 2  | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|          |           |     |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Oct4/pfu | 早期发育      | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| Rex-1    | 早期发育      | +   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| Sox2     | 早期发育      | -   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| FGF4     | 早期发育      | -   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| hTert    | 早期发育      | -   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| Pax2     | 肾脏发育, Met | ND  | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 钙粘素-11   | 肾脏发育      | ND  | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| FoxD1    | 肾脏发育, Met | ND  | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| WT-1     | 肾脏发育, Met | ND  | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| Eya1     | 肾脏发育      | ND  | ND | ND | ND | ND | ND | ND | +  | +  |
| Wnt-4    | 肾脏发育      | ND  | ND | ND | ND | ND | ND | ND | -  | -  |
| SIX2     | Met       | ND  | ND | ND | ND | ND | ND | ND | -  | -  |
| GATA-4   | 内皮        | ND  | ND | ND | ND | ND | ND | ND | -  | -  |
| HNF3B    | 内皮        | ND  | ND | ND | ND | ND | ND | ND | +  | +  |
| CXC-R4   | 内皮        | ND  | ND | ND | ND | ND | ND | ND | +  | +  |
| Sox-17   | 内皮        | ND  | ND | ND | ND | ND | ND | ND | +  | +  |
| Epo      | 肾保护       | ND  | ND | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| EpoR     | 肾保护       | ND  | ND | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| BMP2     | 肾保护       | ND  | ND | +  | +  | +  | +  | +  | ND | ND |
| GDF5     | 肾保护       | ND  | ND | +  | +  | +  | +  | +  | ND | ND |
| BMP7     | 肾脏发育, 存活  | ND  | ND | +  | +  | +  | +  | +  | ND | ND |

[0137] 总之,肾源细胞表达涉及早期发育和肾脏发育的基因。它们表达后肾间充质标记和肾祖细胞标记。它们表达内皮标记以及涉及肾修复和肾小管生成的因子。

[0138] 总之,这些数据证实,肾源细胞是推定的肾祖细胞源,其可用于基于细胞的治疗,以保护或修复受损的肾脏组织。实施例 6 营养因子分泌分析

[0139] 已表明肾源细胞始终生产保护和修复肾脏的营养因子。因此,这些细胞可用作治疗肾脏疾病的治疗剂。

[0140] 将得自分离株 17-21 的第 3 代细胞以 5,000 个细胞/cm<sup>2</sup>、1 个 T75 烧瓶/分离株接

种,每个烧瓶含有 15ml REGM。将细胞在 5%二氧化碳中于 37℃培养。在过夜培养后,将培养基改变为无血清培养基(DMEM-低葡萄糖(Gibco),0.1% (w/v) 牛血清白蛋白(Sigma)、青霉素(50 单位/ml) 和链霉素(50 μg/ml)(Gibco)),并进一步培养 8 小时。在温育结束时以 14,000xg 离心 5 分钟收集条件化的无血清培养基,并储存于 -20℃。

[0141] 用 PBS 洗涤细胞,使用 4ml TrypLE Select(Gibco) 解离,并用 Guava 仪器(Guava Technologies, Hayward, CA) 计数,以估计每个 烧瓶中的细胞数。然后使用 Searchlight 蛋白质组阵列(PierceBiotechnology Inc) 通过 ELISA 测定样品的以下营养因子:金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)、金属蛋白酶组织抑制剂-2(TIMP-2)、血小板衍生的上皮生长因子 bb(PDGF-bb)、角化细胞生长因子(KGF)、干细胞生长因子(HGF)、碱性成纤维细胞生长因子(FGF2)、血管内皮生长因子(VEGF)、肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、转化生长因子 α(TGF α)、脑衍生神经营养因子(BDNF)、基质衍生因子 1b(SDF1b)、睫状神经营养因子(CNTF)、碱性神经生长因子(b-NGF)、神经营养因子-3(NT-3)、生长相关的致癌基因-α(GRO-α)、白介素-1b(IL-1b)、白介素-12p40(IL-12p40)、白介素-12p70(IL-12p70)、白介素-11(IL-11)、白介素-15(IL-15)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、促血管生成素-2(ANG-2) 和人生长激素(HGH)。营养因子生产的分析

[0142] 对分离株 17-21 分析 27 种不同的生长因子和细胞因子的分泌。结果汇总于表 7。所有的分离株都以超过 300pg/ml/ $1 \times 10^6$  个细胞/8 小时分泌 TIMP-1、TIMP-2、VEGF 和 MMP-2。它们以 50-300pg/ml/ $1 \times 10^6$  个细胞/8 小时分泌 FGF2 和 HGF,以 1-50pg/ml/ $1 \times 10^6$  个细胞/8 小时分泌 KGF、PDGF-bb、b-NGF、IL-12p40 和 IL-11。未检测到 SDF-1、ANG-2、HGH 和 IL-12p70。

[0143] 总之,该数据表明,肾源细胞分泌几种用于保护和修复受损的肾脏组织的营养因子。例如,FGF2、HGF 和 TGF α 已经参与肾脏修复。肾源细胞以高恒定水平分泌这些因子。因此,这些细胞是用于以肾脏疾病为目标的疗法的有价值的细胞源。表 7:肾源细胞的营养因子生产的 SearchLight 多重 ELISA 测定分析。分离株项下的“仅培养基”是指没有条件化的单独的无血清培养基对照样品。关于所示数据的单位为 pg/ml/ $1 \times 10^6$  个细胞/8 小时。所示结果 为双份检测的平均值。

| 分离株  | TIMP1  | ANG2  | KGF   | FGF2   | PDGF-bb | HGF   | VEGF  | HB-EGF | TGFa  |
|------|--------|-------|-------|--------|---------|-------|-------|--------|-------|
| 仅培养基 | < 9.8  | < 9.8 | < 2.0 | < 10.9 | < 2     | < 6.2 | < 9.8 | < 3.7  | < 2.3 |
| 17   | 5699.4 | < 9.8 | 20    | 148.4  | < 2     | 91.9  | 416.3 | 46.1   | 67.7  |
| 18   | 6054.8 | < 9.8 | 11.1  | 62.4   | 5.7     | 91    | 329.7 | 35.1   | 59.1  |
| 19   | 6710.6 | < 9.8 | 35.1  | 160.1  | < 2     | 320.9 | 580.5 | 70.2   | 119   |
| 20   | 9483.7 | < 9.8 | 14.1  | 86.6   | 5       | 80.3  | 294.3 | 24.6   | 37.4  |
| 21   | 2705   | < 9.8 | 13.8  | 91.5   | < 2     | 162   | 298.4 | 32.4   | 34.6  |

[0144]

[0145]

| 分离株  | HGH   | SDF1b  | BNGF | MMP9   | IL1b  | MMP2   | GR0a  | MCP1  | IL6   |
|------|-------|--------|------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
| 仅培养基 | < 9.8 | < 50.0 | 1.2  | < 39.1 | < 0.4 | < 62.5 | < 0.8 | 2.1   | < 0.8 |
| 17   | < 9.8 | < 50.0 | 3    | < 39.1 | < 0.4 | 3240   | 36.8  | 29.8  | 38.7  |
| 18   | < 9.8 | < 50.0 | 6.5  | 145    | 1.6   | 3487.6 | 95    | 32.7  | 40.5  |
| 19   | < 9.8 | < 50.0 | 20.8 | < 39.1 | 3.3   | 3565.9 | 37.1  | 48.8  | 44.9  |
| 20   | < 9.8 | < 50.0 | 6.2  | 108    | 1.4   | 3191.3 | 499.8 | 340.9 | 80    |
| 21   | < 9.8 | < 50.0 | 5.8  | < 39.1 | 2.2   | 2814.1 | 14.2  | 30.2  | 19.5  |

| 分离株  | BNDF  | NT3   | IL15  | TIMP2  | IL8   | IL11 | IL12p40 | IL12p70 | CNTF  |
|------|-------|-------|-------|--------|-------|------|---------|---------|-------|
| 仅培养基 | < 6.2 | < 1.6 | < 0.8 | 10     | < 0.8 | < 2  | < 1.2   | < 1.2   | 9     |
| 17   | < 6.2 | < 1.6 | 3.4   | 2266.2 | 31.6  | 20.5 | 14.9    | < 1.2   | 30.1  |
| 18   | < 6.2 | 5.4   | 2.7   | 1841.4 | 115.8 | 20.8 | 6.2     | < 1.2   | < 7.8 |
| 19   | < 6.2 | 13    | 5.2   | 1376.7 | 36.4  | 29.3 | 21.5    | < 1.2   | 93    |
| 20   | 16.2  | 12.3  | 2.3   | 1785   | 622.2 | 20.5 | 8.7     | < 1.2   | 21.7  |
| 21   | < 6.2 | < 1.6 | < 0.8 | 1193   | 12    | 19.1 | 9.3     | < 1.2   | < 7.8 |

[0146] 实施例 7 在聚酯支架上的肾源细胞生长

[0147] 明显需要可用于重建器官组织的基础材料。肾源细胞在合成的聚酯支架上生长，以产生组织样的结构，该结构用作肾脏组织 工程化应用的基础组件材料。

[0148] 肾源细胞在几种聚酯的溶剂流涎膜上生长。制备 100mm 直径的 35/65 聚 (ε - 己

内酯-共-乙交酯)(PCL/PGA) 薄膜。于 70℃将 20g 35/65PCL/PGA(Ethicon,Somerville,NJ)(固有粘度=1.45 分升/克)溶解在 380g 无水 1,4-二噁烷(Aldrich,Milwaukee,WI)中制备 5%(重量)的聚合物溶液。将 3.5ml 聚合物溶液倾在 100×15mm NALGENE 聚甲基戊烯皮氏培养皿(Fisher Scientific,Pittsburgh,PA)上使薄膜流涎。

[0149] 制备 100mm 直径的 45/55 聚(ε-己内酯-共-乙交酯)(PCL/PGA) 薄膜。通过于 70℃将 20g 45/55 PCL/PGA(Ethicon,Somerville,NJ)(固有粘度=1.88 分升/克)溶解在 380g 无水 1,4-二噁烷(Aldrich,Milwaukee,WI)中制备 5%(重量)的聚合物溶液。通过将 3.5ml 聚合物溶液倾在 100×15mm NALGENE 聚甲基戊烯皮氏培养皿(Fisher Scientific,Pittsburgh,PA)上使薄膜流涎。

[0150] 制备 55mm 直径的 45/55 聚(ε-己内酯-共-乙交酯)(PCL/PGA) 薄膜。通过于 70℃将 40g 45/55 PCL/PGA(Ethicon,Somerville,NJ)(固有粘度=1.88 分升/克)溶解在 360g 无水 1,4-二噁烷(Aldrich,Milwaukee,WI)中制备 10%(重量)的聚合物溶液。通过将 5.0ml 或 2.5ml 聚合物溶液倾在 55×15mm 聚丙烯皮氏培养皿(Ted PellaInc.,Redding,CA)上使薄膜流涎。

[0151] 制备 55mm 直径的 40/60 聚(ε-己内酯-共-L-丙交酯)(PCL/PLA) 薄膜。将 40g 40/60 PCL/PLA(Birmingham Polymers,Inc.,Birmingham,Al)(固有粘度=1.20 分升/克)溶解在 360g 无水 1,4-二噁烷(Aldrich,Milwaukee,WI)中制备 10%(重量)的聚合物溶液。通过将 5.0ml 聚合物溶液倾在 55×15mm 聚丙烯皮氏培养皿(Ted PellaInc.,Redding,CA)上使薄膜流涎。

[0152] 所有的流涎膜都被宽松地加盖,并置于通风橱内部,通风橱以 100ft/分钟的速度流量运行 4 天。通过在真空烘箱(0.1-0.2mm Hg)中于 70℃进一步干燥至少 4 天除去膜中的残余溶剂。在冷却至室温后,于室温在 100%乙醇中过夜温育从而将膜灭菌。然后风干膜,用 PBS 洗涤,将分离株 17 或 18 的细胞以 5000 个细胞/cm<sup>2</sup> 接种在薄膜上的 REGM 中,并于 37℃培养 4-9 天。在聚酯支架上的肾源细胞生长分析

[0153] 将分离株 17 或 18 在多种溶剂流涎聚酯膜上的 REGM 中培养,如在表 8 中所概述。在每种情况下,基于 PCL/PGA 的支架支持完整的细胞单层生长。另外,将细胞/薄膜组合构建体由流涎皿中升起,同时保持细胞单层结构。这些肾源细胞/薄膜构建体可以用作组织工程应用中的细胞片材。表 8:在不同薄膜上测试的肾源细胞的汇总

| 分离株    | 支架            |
|--------|---------------|
| 分离株 17 | 35/65 PCL/PGA |
| 分离株 18 | 45/55 PCL/PGA |
| 分离株 18 | 60/40 PCL/PLA |
| 分离株 18 | 45/55 PCL/PGA |
| 分离株 18 | 35/65 PCL/PGA |

[0154] 实施例 8 在体外的肾源细胞肾小管生成

[0155] 可以融化处于第 4 代和第 10 代的肾源细胞,然后以 4×10<sup>4</sup> 个细胞/ml 在含有 66% vitrogen 100(3mg/ml(CohesionTechnologies,Palo Alto,CA))的 I 型胶原溶液中研磨为单细胞悬浮液。可将悬浮液中的细胞铺在脱细胞的网膜上。然后可于 37℃,5% CO<sub>2</sub>,95% 空气温育胶原/细胞混合物 30 分钟,以使胶原凝胶化,然后加入培养基。细胞在 7 天内每 3 天喂饲 1 次。在第 7 天时,用可变浓度的肝细胞生长因子处理培养物,并进一步培养,直至观察到肾小管生成。



[0156] 这些观察结果证实,肾源细胞可在体外自组织化为小管结构。这些结构值得作为用于肾脏重建应用以及开发药物筛选和毒性测定的组件。实施例 9 用于药物筛选和毒性测定的肾源细胞

[0157] 人肾源细胞为新的治疗分子的体外开发和安全性评价提供了新机会。来源于肾源细胞的肾小管使得能够开发肾毒性以及肾源性模型系统,用于开发新的肾脏再生或肾脏保护药物。该肾源细胞药物开发和毒性测定平台系统将增强用于肾脏疾病治疗的新化合物的研究和开发。

[0158] 可使用在实施例 8 中描述的方法将肾源细胞以 5,000 个细胞/cm<sup>2</sup> 铺板入 96 孔板的孔中。这些板用作测定系统,用于测试多种化合物和小分子的增强或阻止肾小管形成的能力。为测定多种化合物的作用,通过光学显微镜分析各个孔的肾小管形成和肾小管分支网络的形成。另外,可使用在实施例 5 中描述的方法对每个孔中的细胞进行 RT-PCR。

[0159] 肾源细胞可以 96 孔形式培养,并可通过加入多种化合物和小分子药物调节肾小管生成。不同的生长因子和药物可诱导肾源细胞肾小管生成和分支,以及增加 BMP-7、BMP-2、GDF5、BMP 受体 -1 和 BMP 受体 -2 的基因表达。这些基因的上调与增加的肾小管形成相关。BMP-7 增加还提示,测试药物将通过增加受损肾脏的 BMP-7 促进肾脏修复。同样,基因表达下调或没有与肾小管生成或细胞毒性的抑制以及测试药物刺激肾脏修复的能力下降相关。

[0160] 总之,肾源细胞形成肾小管的能力的开发利用以及 BMP 分子及其受体的表达提供了开发新药物发现和毒理学测定平台系统的机会。该测定系统将增强治疗肾脏疾病的新化合物的研究和开发。 实施例 10 肾源细胞多能性

[0161] 肾源细胞是潜在的祖细胞来源,能够分化为脂肪细胞和成骨细胞。该数据证实了肾源细胞的多能特性,并进一步阐明了其作为祖细胞的特征。

[0162] 对于分化测定,肾源细胞可在 5% CO<sub>2</sub> 下于 37℃ 的 REGM 培养基中培养 1 周,之后变为形成脂肪细胞的分化培养基 (DMEM/F12, 3% FCS, 33 μmol 生物素、17 μmol 泛酸盐、100nmol 胰岛素、1 μmol 地塞米松、0.25 μg/ml 两性霉素 B 和 0.25mmol IBMX) 或成骨性分化培养基 (DMEM, 10% FCS, 0.2mmol 抗坏血酸, 25mmol β-甘油磷酸盐, 500nmol 地塞米松, 和 20nmol 谷氨酰胺)。细胞可再培养 3 周,培养基每 2 天更换 1 次,然后在 4% 多聚甲醛中固定 10 分钟。用 Nile Red (Molecular Probes; 1 : 2000 的 PBS 溶液) 染色 15 分钟鉴定脂肪细胞。使用 0.1mg/ml Fast Blue BB 盐 (Sigma), 0.1mg/ml NaphtholAS-MX 磷酸盐 (Sigma) 和 2mmol MgCl<sub>2</sub> 的 0.1mol Tris-HCl (pH 8.5) 溶液的碱性磷酸酶测定鉴定成骨细胞。图像用连接 Nikon TS 100ECLIPSE 倒置显微镜的 Nikon 数码照相机捕获。10T1/2 细胞在分化测定中用作阳性对照。

[0163] 在成脂肪培养基中 3 周后,可通过肾源细胞的胞质区室中 Nile Red 染色液滴的累积鉴定脂肪细胞。在成骨培养基中 3 周后,可通过与仅在 REGM 中生长的肾源细胞相比碱性磷酸酶活性增加从而鉴定成骨细胞。

[0164] 总之,该数据进一步表明,肾源细胞是潜在的祖细胞,能够分化为至少两种不同的细胞谱系-脂肪细胞和成骨细胞。这些细胞因此为肾脏再生和细胞治疗用途的细胞源。实施例 11 在体内的肾源细胞肾小管生成

[0165] 用人肾源细胞 (10,000 个细胞/cm<sup>2</sup>) 接种 3 个 35/65PCL/PGA (10cm 直径 × 2mm 厚

度)薄膜,并在 REGM(Cambrex) 中于 37℃和 5%二氧化碳中培养 8 天(如在实施例 7 中所述)。按照在美国专利 6,355,699 中描述的方法制备 35/65PCL/PGA 泡沫支架,该专利整体在此引入作为参考。然后由薄膜流涎皿中取出细胞/薄膜构建体,堆积为 3 层,并施加至 35/65PCL/PGA 泡沫支架支持体。然后再培养该构建体 24 小时,接着切成 3×3mm 方形小块,之后植入。然后用 PBS 洗涤植入体,并转移至装填 PBS 的 6 孔板,以便运输。

[0166] 将植入体双向皮下植入 SCID 小鼠的背侧腰胸区。雄性 SCID 小鼠(Fox Chase SCID CB17SC 品系)购自 Taconic Inc.,(Hudson, NY),为 5 周龄。将两个植入体置于每个 SCID 小鼠中。在小鼠的背上制作两个皮肤切口,每个切口约 5mm 长。切口在腰部区域上横向处于颅侧距可触知的髂嵴约 5mm 处,中线的每一侧 1 个。然后将皮肤与基底的结缔组织分离,以制备小口袋,将植入体放置于颅侧距切口约 10mm 处。皮肤切口用 Reflex 7 金属伤口夹闭合。在 3 周后,由皮下袋取出植入体,固定在 10%福尔马林中,嵌入石蜡中,制作切片,用苏木精和曙红(H&E)染色,并由病理学家使用光学显微镜技术评价。

[0167] 肾源细胞在 PCL/PGA 薄膜层中形成小管样结构。这些小管显示出与众不同的上皮壁和透明腔。肾源细胞浸润泡沫支架,沉积在胞外基质上,并形成致密的组织样结构。另外,在泡沫中的肾源细胞刺激血管生成和血管网络的形成。

[0168] 总之,人肾脏特异性细胞在接触体内微环境后形成小管结构。肾源细胞响应于微环境信号并指示细胞形成小管的能力进一步证实了这些细胞的肾祖细胞性质。另外,细胞迁移到泡沫支架中,形成促进血管生成的组织样结构。该数据表明了肾源细胞作为细胞组件重建肾小管并最终用于肾脏组织工程应用的用途。实施例 12 肾源细胞在肾病动物模型中是肾保护性的

[0169] 肾源细胞分泌几种涉及肾脏修复和再生的营养因子(参见实施例 6)。因此,当将肾源细胞给予持续肾伤害的动物时,细胞将产生保护和修复受损肾脏的营养因子。将在药物诱导的伤害、缺血回流伤害和输尿管阻塞诱导的伤害的 3 种不同肾衰竭动物模型中测试肾源细胞的肾保护性。肾衰竭的诱导

[0170] 将如下诱导缺血/回流伤害。将小鼠置于具有足量水的干净笼中。通过剪掉毛发对手术区域备皮。经腹膜内注射克他命(100mg/kg)和甲苯噻嗪(mg/kg)麻醉小鼠(6-8 周龄的 C57BL/6J 小鼠购自 The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)。麻醉程度通过没有趾收缩反射评价。

[0171] 将麻醉的小鼠背侧朝下放置,用碘消毒腹侧。首先在皮肤中制作小中线切口,然后在腹膜肌中制作。轻缓地将肠搁在旁边,露出肾脏,找出肾动脉。使用血管钳钳住两条肾动脉 25 或 30 分钟。在此时间内,使用水循环加热垫保持小鼠温热。另外,用无菌的温热盐水和浸没在温热盐水中的无菌纱布片使暴露区域保持温热。30 分钟后,移开血管钳,用 1 或 2 根不连续的缝合线缝合腹膜壁,用伤口夹闭合皮肤。使用单次皮下注射的顺铂(5 或 10mg/kg)在小鼠中实施药物诱导的肾衰竭。

[0172] 如下在小鼠中产生输尿管阻塞诱导的肾衰竭。用异氟烷麻醉小鼠(1-3%)。对腹部剃毛,并用 70%酒精继之以碘洗涤。制作 2 厘米腹部中线切口,并打开腹壁。将左肾和输尿管与脂肪切离。将 2 根不可吸收的 8-0 线放置在输尿管上,然后将输尿管在绷带之间横断。将肠返回到腹部,肌肉层用 4-0 Dexon 闭合,皮肤用订书钉闭合。细胞移植

[0173] 在细胞注射时,肾源细胞将于 37℃(水浴)融化,并以 PBS 洗涤 2 次,并重悬浮在

1ml PBS 中。细胞将使用血细胞计数器计数。细胞存活力通过锥虫蓝染料排除确定。细胞在注射时必须具有 75% 以上的存活力。如果存活力低于 75%，则将细胞废弃。以  $0.5 \times 10^6$  个细胞 / 300  $\mu$ l PBS 或  $0.1 \times 10^6$  个细胞 / 300  $\mu$ l PBS 的浓度重配细胞。使用配有 26 号针头的 1ml 注射器将悬浮在 PBS (载体溶媒) 中的细胞注射入面前静脉。对于缺血 / 回流研究和输尿管阻塞诱导的伤害研究, 在伤害后 2 小时用细胞或 PBS 注射 10 只小鼠 / 治疗组。对于药物诱导的肾衰竭研究, 所有动物都在伤害后 24 小时接受细胞或 PBS。

[0174] 在诱导肾衰竭之前和在第 2、5 和 7 天, 由尾静脉收集血样 (50  $\mu$ l)。使用 HPLC 检测分析血清肌酐。使用 Roche Diagnostics Systems (Branchburg, NJ) 的检测试剂盒检测血尿素氮 (BUN) 水平。

[0175] 由于肾保护性营养因子的分泌, 肾源细胞可在肾衰竭动物模型中防止肾损伤。实施例 13 在梗阻性肾病的啮齿动物模型中评价人肾源细胞的肾保护功效

[0176] 中试研究的目的是评价人肾源细胞 (hKDC) 在单侧输尿管阻塞 (UUO) 的肾衰竭模型中的肾保护性作用。UUO 模型是短期阻塞性肾病和肾小管间质纤维化的有效模型。为评价肾保护性效力, 在细胞移植后 12 天的受伤害小鼠中评价细胞生物分布、血尿素氮 (BUN)、血清肌酐 (SCr) 和组织学伤害。在该报告中, 数据表明, 在验尸时, 在受伤害和未受伤害的肾脏中均存在 hKDC。组织学评价证实, 给予  $0.2 \times 10^6$  个 hKDC 使输尿管阻塞诱导的肾小管伤害的整体程度产生可检测的减轻。

[0177] 尽管慢性肾病 (CKD) 有许多不同的病因, 但导致纤维化的肾小管间隙炎症是慢性肾衰竭的组织学标志。尽管血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素受体阻断剂针对 CKD 的广泛应用呈现出显著的医学成就, 但这些药物很少阻止肾纤维化。因此, 开发防止或抑制间质纤维化形成的新策略是改善当前医护标准的重要目标。尽管工作集中于开发药理学的基于小分子的疗法, 但研究限于基于细胞疗法的方案。

[0178] 近期研究已证实, 骨髓源的间充质干细胞 (MSC) 是向肾的, 在药物和缺血再灌注诱导的损伤后帮助修复肾脏。Morigi 等, 间充质干细胞是向肾的, 在急性肾衰竭中帮助修复肾脏和改善功能 (Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure.) J Am Soc Nephrol. 2004 年 7 月; 15(7):1794-804; Klahr 和 Morrissey. 阻塞性肾病和肾纤维化 (Obstructive nephropathy and renal fibrosis.) Am. J Renal Physiol. 2002 年 11 月; 283(5):F861-75. 2002。还表明 MSC 能够阻止甘油诱发的急性肾衰竭。Herrera 等, 间充质干细胞有助于急性肾小管上皮损伤的肾修复 (Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury.) Int. J Mol Med. 2004 年 12 月; 14(6):1035-41。令人感兴趣的是, 这些 MSC 介导的保护作用可能不通过干细胞分化机制起作用, 而是通过分泌防止细胞伤害以及促进上皮和内皮修复的重要营养因子起作用。

[0179] MSC 实际上在几种动物模型中改善急性肾损伤的结果, 但仍未确定 MSC 是否可在慢性肾脏疾病中延迟肾衰竭。近来研究已表明, 移植的 MSC 可在 Alport 病的小鼠模型中防止肾小管周围毛细血管损失, 以及减少肾纤维化标记。Ninichuk 等人, 多能间充质干细胞在胶原 4A3 缺陷小鼠中降低间质纤维化但不延迟慢性肾病的发展 (Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen 4A3-deficient mice) Kidney Int. 2006 年 7 月; 70(1):

121-9。令人遗憾的是,该研究还表明,移植的MSC不能促进动物存活乃至延迟肾衰竭发作。

[0180] 在本研究中,研究 hKDC 在 小鼠 UUO 模型中的肾保护性和抗纤维化作用。阻塞性肾病的 UUO 模型已被证实是研究在肾间质中发生的分子和细胞变化的有价值工具。该模型还显示出确定治疗功效的用途,所述治疗的目标在于停止乃至逆转纤维化,并最终停止乃至逆转许多慢性肾病的发展。

[0181] 方法

[0182] 动物模型。用 1-3 % 异氟烷麻醉 13 只雌性 C57BL/6J 小鼠(The Jackson Laboratory,Bar Harbor,Maine)。对每只动物的腹部剃毛,并用 70%酒精继之以优碘清洁。制作中线腹部切口。打开腹壁,将肠移出至胸腔上,并用湿纱布保护。定位左肾,将输尿管与脂肪切离。将 2 根不可吸收的 8-0 线放置在输尿管上。对于假治疗组,不使用线。将肠返回到腹部,将 1 立方厘米的热盐水置于腹腔中。然后用 4-0Dexon 闭合肌肉层,皮肤用订书钉闭合。中止异氟烷,在加热垫上用 100%氧气使小鼠恢复,直至能够活动。

[0183] 细胞制备。分离批号 032906 的第 6 代 hKDC,并如实施例 1 及 CBAT 发明报告“Isolation of Human Kidney Derived Cells(Study2)”,2006年3月29日,David Colter, Agnes Seyda,Charito Buensuceso,Walter Laredo) 中所述扩增。由 Stem Cell Internal Venture(Radnor,PA) 获得 HUTC(批号 2512380,第 6 代)。

[0184] 细胞移植。在动物由手术恢复后,立即于 37℃融化 HUTC 和第 10 代 hKDC,用 Hanks 平衡盐溶液 w/o  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  (HBSS) 洗涤 2 次,并重悬浮在 1ml HBSS 中。然后使用血细胞计数器计数细胞,并通过锥虫蓝染色排除确定细胞存活力。以  $1.0 \times 10^6$  个存活细胞/ml 的浓度在 HBSS 中重配细胞。然后使用 1ml 配有 27 号针头的注射器经尾静脉注射移植在 200  $\mu$ l HBSS 中重悬浮的细胞。表 9. 实验设计。模拟动物进行手术程序。然而,输尿管不阻塞。

[0185] 生物分布。所有动物都在细胞移植后 12 天通过二氧化碳窒息处死。由每只动物取出肾脏、肺、脑和心脏。然后将每个肾脏的一半固定在 10%中性缓冲的福尔马林中,用于组织学分析。余下的一半肾脏和所有其它器官都在液氮中速冻。然后使用配有 7mm 一次性转子定子发动探头的 Omni TH 匀浆器(Omni International,Inc.,Marietta,GA) 匀化所有冷冻器官。然后使用 RNeasy Plus 小型试剂盒(Qiagen,Valencia,CA) 提取总 RNA。用 50  $\mu$ l DEPC 处理的水洗脱 RNA,并使用 NanoDrop 1000(NanoDrop Technologies,Wilmington,DE) 定量。然后使用随机六聚体和 Taqman 逆转录试剂(Applied Biosystems,Foster City,CA) 逆转录 RNA。然后使用人特异性  $\beta$ 2 微球蛋白引物探针(目录号 4310886E, Applied Biosystems,Foster City,CA) 对 cDNA 样品进行 PCR 反应。然后使用 ABI Prism 7900 HT 测序系统(AppliedBiosystems,Foster City,CA) 进行 PCR。

[0186] 血清化学分析。在尸检时,收集全血,使其凝结,放置于微离心管中,并以 2500rpm 离心 15 分钟,以分离血清和其它血液组分。然后使用 VetAce 化学分析仪(Alpha Wassermann DiagnosticTechnologies,LLC,West Caldwell,NJ) 分析血清样品。

[0187] 组织学评价。将固定的肾脏组织嵌入石蜡,制作切片(5  $\mu$ m 厚),并用苏木精/曙红(H&E) 和马松三色染色。使用在 1-4 范围内的记分指数(1 = 最小的,2 = 轻微,3 = 中等,4 = 严重) 记分切片的肾小管伤害(肾小管坏死、扩张、间质细胞浸润) 和间质纤维化(胶原沉积)。评价者对治疗组分配是盲的。 结果

[0188] 生物分布。为评价移植细胞在体内器官的生物分布,利用基于 RT-PCR 的方法。利

用对人  $\beta$  2 微球蛋白 RNA 转录物特异性的实时 PCR 引物 / 探针。如在表 10 和中所示, HUTC 和 hKDC 均能在许多但不是全部的动物中检测到。假治疗由于没有人细胞被移植入这些动物中这一事实而用作有效的阴性对照。如在表 10 中所示, 得自动物 1 的心脏在全部 3 个重复检测中均显示出 Ct 值。该样品的平均 Ct 值为 36.5。因此, 当表 10 中所示的全部 3 个重复检测均具有阳性 Ct 值且平均 Ct 值  $< 36.5$  时确定阳性信号。由于动物 1 没有接受人细胞这一事实, 36.5 以上的 Ct 值表明没有检测到人细胞。如在表 11 中所示, 没有来自假治疗动物的组织显示出人细胞转录物。然而, 在 5 只测试动物中的 2 只的器官中检测到 HUTC。在动物 7 的肺、受损肾脏和未受损肾脏中以及动物 8 的未受损肾脏、脑和肺中检测到所述细胞。在测试的 5 只动物的 3 只中检测到 hKDC。在动物 11 的受损肾脏、未受损肾脏、心脏、脑和肺中检测到所述细胞。它们还在动物 12 的受损肾脏、未受损肾脏和心脏中被检测到。还在动物 13 的未受损肾脏、心脏和肺中检测到 hKDC。

[0189] 血清化学。为评价肾功能, 检测 BUN 和 SCr。在单侧阻塞模型中, 两个肾脏中的一个保持未受损。因此动物能够补偿受损肾脏所遭受的任何肾功能损失。因为余下的未受损肾脏, 预期 BUN 和 SCr 在正常范围内。如在表 12 中所示, BUN 和 SCr 的血清水平在所有治疗组之间保持不变。假治疗显示平均 BUN 检测值为  $20.7 \pm 3.2 \text{ mg/dL}$ , SCr 为  $0.4 \pm 0.06 \text{ mg/dL}$ 。HUTC 治疗产生的平均 BUN 检测值为  $25.6 \pm 5.0 \text{ mg/dL}$ , SCr 为  $0.4 \pm 0.07$ 。hKDC 治疗产生的平均 BUN 检测值为  $26.0 \pm 4.7 \text{ mg/dL}$ , SCr 为  $0.4 \pm 0.04 \text{ mg/dL}$ 。

[0190] 组织学。在假治疗、HUTC 治疗和 hKDC 治疗的动物的组织切片中定量检测肾小管伤害和间质纤维化程度。如在表 13 中所示, 假治疗导致最小的肾小管伤害, 在评价的全部 3 种动物中的记分为 1.0。HUTC 治疗产生最小的肾小管修复, 平均伤害记分为 4.0。然而, 与 HUTC 治疗相比, hKDC 治疗导致整体的肾小管伤害程度减轻, 全部 5 只动物都显示出 3.0 的伤害记分。对于纤维化变化, 假治疗的动物在肾脏间质中显示出最低程度的胶原沉积, 并因此显示出最低的纤维化 (平均记分 = 1.0)。然而, HUTC 和 hKDC 治疗显示出轻微纤维化的证据, 平均记分分别为 2.4 和 2.0。

[0191] 在该报告中描述了 hKDC 的肾保护和抗纤维化作用。数据表明, 移植的人细胞在移植后 12 天存在于受伤害肾脏和未受伤害的肾脏中。与 hUTC 治疗相比, hKDC 治疗使总体肾小管损伤程度产生可检测的减轻。因此, 该中试研究表明, hKDC 在肾阻塞性肾病的 UUO 模型中激发肾保护性作用。表 10 : 生物分布。通过 RT-PCR 评价器官组织的人  $\beta$  2 微球蛋白 RNA 转录物的存在情况。对每个组织进行 3 次分析。参考表 9 的治疗组分配。“Ct”, 阈循环。“nd”, 未检测。“肾脏 (I)”, 受损的肾脏。此处显示的数据汇总于表 11。

| 治疗组 1 |    |       | 治疗组 2 |       |       | 治疗组 3 |       |       |
|-------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 动物    | 组织 | Ct    | 动物    | 组织    | Ct    | 动物    | 组织    | Ct    |
| 1     | 心脏 | 35.78 | 4     | 肾脏(I) | 37.86 | 9     | 肾脏(I) | nd    |
| 1     | 心脏 | 37.20 | 4     | 肾脏(I) | nd    | 9     | 肾脏(I) | nd    |
| 1     | 心脏 | 36.40 | 4     | 肾脏(I) | nd    | 9     | 肾脏(I) | nd    |
| 1     | 脑  | nd    | 4     | 心脏    | nd    | 9     | 心脏    | nd    |
| 1     | 脑  | nd    | 4     | 心脏    | nd    | 9     | 心脏    | nd    |
| 1     | 脑  | 39.13 | 4     | 心脏    | nd    | 9     | 心脏    | nd    |
| 1     | 肺  | nd    | 4     | 脑     | nd    | 9     | 脑     | 37.37 |
| 1     | 肺  | 37.76 | 4     | 脑     | nd    | 9     | 脑     | nd    |
| 1     | 肺  | nd    | 4     | 脑     | nd    | 9     | 脑     | nd    |
| 2     | 心脏 | nd    | 4     | 肺     | nd    | 9     | 肺     | nd    |
| 2     | 心脏 | nd    | 4     | 肺     | 35.84 | 9     | 肺     | nd    |

|   |    |       |   |       |       |    |       |       |
|---|----|-------|---|-------|-------|----|-------|-------|
| 2 | 心脏 | nd    | 4 | 肺     | nd    | 9  | 肺     | nd    |
| 2 | 脑  | nd    | 5 | 肾脏(I) | nd    | 10 | 肾脏(I) | nd    |
| 2 | 脑  | nd    | 5 | 肾脏(I) | nd    | 10 | 肾脏(I) | 37.36 |
| 2 | 脑  | nd    | 5 | 肾脏(I) | nd    | 10 | 肾脏(I) | nd    |
| 2 | 肺  | nd    | 5 | 心脏    | nd    | 10 | 心脏    | nd    |
| 2 | 肺  | nd    | 5 | 心脏    | nd    | 10 | 心脏    | nd    |
| 2 | 肺  | nd    | 5 | 心脏    | nd    | 10 | 心脏    | nd    |
| 3 | 心脏 | 38.72 | 5 | 脑     | nd    | 10 | 脑     | nd    |
| 3 | 心脏 | nd    | 5 | 脑     | 32.80 | 10 | 脑     | nd    |
| 3 | 心脏 | nd    | 5 | 脑     | nd    | 10 | 脑     | nd    |
| 3 | 脑  | nd    | 5 | 肺     | nd    | 11 | 肾脏(I) | 36.48 |
| 3 | 脑  | nd    | 5 | 肺     | nd    | 11 | 肾脏(I) | 38.58 |
| 3 | 脑  | nd    | 5 | 肺     | nd    | 11 | 肾脏(I) | 35.72 |
| 3 | 肺  | nd    | 6 | 肾脏(I) | nd    | 11 | 肾脏    | 32.57 |
| 3 | 肺  | nd    | 6 | 肾脏(I) | nd    | 11 | 肾脏    | 32.22 |
| 3 | 肺  | nd    | 6 | 肾脏(I) | nd    | 11 | 肾脏    | 31.61 |
|   |    |       | 6 | 心脏    | nd    | 11 | 心脏    | 33.55 |
|   |    |       | 6 | 心脏    | nd    | 11 | 心脏    | 34.21 |
|   |    |       | 6 | 心脏    | nd    | 11 | 心脏    | 32.91 |
|   |    |       | 6 | 脑     | nd    | 11 | 脑     | 35.33 |
|   |    |       | 6 | 脑     | nd    | 11 | 脑     | 34.94 |
|   |    |       | 6 | 脑     | 37.62 | 11 | 脑     | 35.28 |
|   |    |       | 6 | 肺     | nd    | 11 | 肺     | 33.73 |
|   |    |       | 6 | 肺     | nd    | 11 | 肺     | 34.01 |
|   |    |       | 6 | 肺     | nd    | 11 | 肺     | 33.99 |
|   |    |       | 7 | 肾脏(I) | 33.41 | 12 | 肾脏(I) | 34.62 |
|   |    |       | 7 | 肾脏(I) | 33.12 | 12 | 肾脏(I) | 34.84 |

|   |       |       |    |       |       |
|---|-------|-------|----|-------|-------|
| 7 | 肾脏(I) | 33.45 | 12 | 肾脏(I) | 34.51 |
| 7 | 肾脏    | 34.07 | 12 | 肾脏    | 34.94 |
| 7 | 肾脏    | 33.78 | 12 | 肾脏    | 35.55 |
| 7 | 肾脏    | 33.81 | 12 | 肾脏    | 34.32 |
| 7 | 心脏    | nd    | 12 | 心脏    | 34.52 |
| 7 | 心脏    | 38.79 | 12 | 心脏    | 34.71 |
| 7 | 心脏    | 39.97 | 12 | 心脏    | 34.38 |
| 7 | 脑     | nd    | 12 | 脑     | 25.19 |
| 7 | 脑     | nd    | 12 | 脑     | nd    |
| 7 | 脑     | nd    | 12 | 脑     | nd    |
| 7 | 肺     | 31.69 | 12 | 肺     | nd    |
| 7 | 肺     | 31.84 | 12 | 肺     | nd    |
| 7 | 肺     | 31.92 | 12 | 肺     | 39.21 |
| 8 | 肾脏(I) | nd    | 13 | 肾脏(I) | nd    |
| 8 | 肾脏(I) | nd    | 13 | 肾脏(I) | 38.66 |
| 8 | 肾脏(I) | nd    | 13 | 肾脏(I) | nd    |
| 8 | 肾脏    | 34.16 | 13 | 肾脏    | 33.52 |
| 8 | 肾脏    | 34.61 | 13 | 肾脏    | 33.36 |
| 8 | 肾脏    | 34.08 | 13 | 肾脏    | 32.69 |
| 8 | 心脏    | nd    | 13 | 心脏    | 34.76 |
| 8 | 心脏    | nd    | 13 | 心脏    | 34.55 |
| 8 | 心脏    | nd    | 13 | 心脏    | 34.28 |
| 8 | 脑     | 31.59 | 13 | 脑     | nd    |
| 8 | 脑     | 31.73 | 13 | 脑     | 38.78 |
| 8 | 脑     | 31.76 | 13 | 脑     | 38.01 |
| 8 | 肺     | 32.64 | 13 | 肺     | 33.52 |
| 8 | 肺     | 32.96 | 13 | 肺     | 33.79 |
| 8 | 肺     | 33.44 | 13 | 肺     | 34.11 |

表 11 : 生物分布汇总。显示的数据描述了对人细胞阳性的动物数字 / 测试



动物总值 < 36.5 时确定阳性信号。参考表 9 的治疗组“肾脏(I)”,受损的肾脏。

|       | 组 1 | 组 2 | 组 3 |
|-------|-----|-----|-----|
| 肾脏(I) | nd  | 1/5 | 2/5 |
| 肾脏    | nd  | 1/5 | 3/5 |
| 心脏    | 0/3 | 0/5 | 3/5 |
| 脑     | 0/3 | 1/5 | 1/5 |
| 肺     | 0/3 | 1/5 | 2/5 |

表 12 :血清化学。参考表 9 的治疗组分配。SEM, 平均值标准偏差。

| 治疗 | 动物编号 | BUN (mg/dL)           | 肌酸酐(mg/dL)            |
|----|------|-----------------------|-----------------------|
| 1  | 1    | 22                    | 0.4                   |
|    | 2    | 23                    | 0.4                   |
|    | 3    | 17                    | 0.3                   |
|    |      | 平均值: 20.7<br>SEM: 3.2 | 平均值: 0.4<br>SEM: 0.06 |
| 2  | 4    | 24                    | 0.4                   |
|    | 5    | 21                    | 0.5                   |
|    | 6    | 26                    | 0.4                   |
|    | 7    | 23                    | 0.4                   |
|    | 8    | 34                    | 0.3                   |
|    |      | 平均值: 25.6<br>SEM: 5.0 | 平均值: 0.4<br>SEM: 0.07 |
| 3  | 9    | 33                    | 0.5                   |
|    | 10   | 24                    | 0.4                   |
|    | 11   | 20                    | 0.4                   |
|    | 12   | 26                    | 0.4                   |
|    | 13   | 27                    | 0.4                   |
|    |      | 平均值: 26.0<br>SEM: 4.7 | 平均值: 0.4<br>SEM: 0.04 |

表 13 :组织学。使用在 1-4 范围内的记分指数 (1 = 最小的, 2 = 轻微, 3 = 中等, 4 = 严重) 以盲方式记分肾小管伤害 (肾小管坏死、扩张和间质细胞浸润) 和纤维化 (胶原沉积) 的程度。

## 治疗组 1

| 动物       | 纤维化 | 肾小管伤害    |
|----------|-----|----------|
| 1        | 1   | 1        |
| 2        | 1   | 1        |
| 3        | 1   | 1        |
| 平均值: 1.0 |     | 平均值: 1.0 |

## 治疗组 2

| 动物       | 纤维化 | 肾小管伤害    |
|----------|-----|----------|
| 4        | 2   | 4        |
| 5        | 2   | 4        |
| 6        | 2   | 4        |
| 7        | 3   | 4        |
| 8        | 3   | 4        |
| 平均值: 2.4 |     | 平均值: 4.0 |

## 治疗组 3

| 动物       | 纤维化 | 肾小管伤害    |
|----------|-----|----------|
| 9        | 2   | 3        |
| 10       | 2   | 3        |
| 11       | 2   | 3        |
| 12       | 2   | 3        |
| 13       | 2   | 3        |
| 平均值: 2.0 |     | 平均值: 3.0 |

[0192] 本申请中提及的所有出版物和专利申请都针对所有方面整体在此引入作为参考,如同每个单独的出版物或专利申请都具体和单独地被指出针对所有方面在此引入作为参考一样。

[0193] 尽管为了透彻理解目的已通过阐述和实施例相当详细地描述了上文的发明,但对本领域一般技术人员显而易见的是,根据本发明的讲述,可在不偏离随附权利要求的精神或范围的情况下,对本发明实施某些改变和修改。