

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106459913 B

(45) 授权公告日 2021.05.18

(21) 申请号 201580018440.2

(73) 专利权人 迈索布拉斯特国际有限公司

(22) 申请日 2015.04.07

地址 瑞士梅兰

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 S·伊泰斯库 P·西蒙斯

申请公布号 CN 106459913 A

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(43) 申请公布日 2017.02.22

代理人 张小勇

(30) 优先权数据

(51) Int.CI.

2014901247 2014.04.07 AU

C12N 5/0775 (2010.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 35/28 (2015.01)

2016.10.08

A61P 7/02 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 9/10 (2006.01)

PCT/EP2015/057521 2015.04.07

审查员 陶治

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/155187 EN 2015.10.15

权利要求书2页 说明书21页 附图2页

(54) 发明名称

改良的干细胞组合物

(57) 摘要

本公开提供了表达高水平的血管生成素-1 (Ang1) 的干细胞和其产生方法。此类干细胞可以用于一系列治疗应用。

1. 一种组合物,其包含培养扩增的未遗传修饰的STRO-1+间质前驱细胞(MPC)群体,其中培养扩增的细胞表达血管生成素-1(Ang1)和血管内皮生长因子(VEGF),其中[Ang1:VEGF]比率为2:1至30:1,其中在包含L-抗坏血酸钠盐的培养基中、在包含L-抗坏血酸钠盐和少于10%v/v胎牛血清(FCS)的培养基中、在包含L-抗坏血酸钠盐和非胎儿血清的培养基中、或者在包含L-抗坏血酸钠盐、少于10%v/v胎牛血清(FCS)和非胎儿血清的培养基中培养扩增细胞。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述MPC表达比率为5:1至20:1的Ang1:VEGF。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中所述MPC表达0.1 μ g/10⁶个细胞至1.0 μ g/10⁶个细胞的量的Ang1。

4. 根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中所述MPC表达少于0.05 μ g/10⁶个细胞的量的血管内皮生长因子(VEGF)。

5. 根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中所述MPC表达少于0.03 μ g/10⁶个细胞的量的血管内皮生长因子(VEGF)。

6. 根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其进一步包含可接受的药物载剂。

7. 根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中所述细胞培养基包含至少5%v/v FCS。

8. 一种用于生产表达血管生成素-1(Ang1)和血管内皮生长因子(VEGF)的STRO-1+间质前驱细胞(MPC)的体外方法,其中[Ang1:VEGF]比率为2:1至30:1,所述方法包括:

在细胞培养基中培养未遗传修饰的STRO-1+间质前驱细胞(MPC)群体,其中所述细胞培养基含有L-抗坏血酸钠盐;

所述细胞培养基含有L-抗坏血酸钠盐和少于10%v/v胎牛血清(FCS);

所述细胞培养基含有L-抗坏血酸钠盐和非胎儿血清;或者

所述细胞培养基含有L-抗坏血酸钠盐、少于10%v/v胎牛血清(FCS)和非胎儿血清。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述方法进一步包括测量Ang1和VEGF水平以确定Ang1:VEGF比率。

10. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述方法进一步包括选择具有比率为2:1至30:1的Ang1:VEGF的细胞。

11. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述细胞培养基补充至少5%v/v FCS。

12. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述细胞培养基补充一种或多种选自由以下组成的组的刺激因子:1 α ,25-二羟基维生素D₃(1,25D)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和基质衍生因子1 α (SDF-1 α)。

13. 根据权利要求8所述的方法,其中所述细胞培养基补充非胎儿血清。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述非胎儿血清是新生血清。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述新生血清是新生牛血清(NBCS)。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述新生血清是人类血清。

17. 根据权利要求13所述的方法,其中所述非胎儿血清是成年血清。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述成年血清是人类血清。

19. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述细胞培养基含有至少5%v/v水

平的NBCS。

20. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述细胞培养基含有至少2%v/v水平的NBCS。

21. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述细胞培养基补充NBCS与FCS的混合物。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中NBCS与FCS的比率是1:1。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中所述培养基补充5%v/v FCS和5%v/v NBCS。

24. 一种获得适用于促进血管形成和/或血管生成的未遗传修饰的间质前驱细胞(MPC)的方法,所述方法包括:

从至少一个供体获得包括MPC的至少一个细胞群体;

根据权利要求8至23中任一项所述的方法培养所述MPC;

确定所述至少一个细胞群体每一者中所述MPC表达的Ang1和VEGF的量;以及

选择表达比率为2:1至30:1Ang1:VEGF的MPC。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中选择表达至少20:1比率的Ang1:VEGF的所述MPC。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中选择表达至少30:1比率的Ang1:VEGF的所述MPC。

27. 根据权利要求24所述的方法,其中选择表达至少50:1比率的Ang1:VEGF的所述MPC。

28. 一种MPC群体,其根据权利要求8至23中任一项所述的方法培养或通过根据权利要求24至27中任一项所述的方法获得。

29. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述MPC通过根据权利要求8至23中任一项所述的方法培养MPC群体产生,或通过根据权利要求24至27中任一项所述的方法获得。

30. 一种根据权利要求1至7中任一项所述的组合物或根据权利要求8至27中任一项所述的方法的用途,其用于制造供促进血管形成和/或血管生成用的药物。

改良的干细胞组合物

技术领域

[0001] 本公开涉及表达高水平血管生成素-1 (Ang1) 的干细胞和其产生 方法。此类干细胞可以用于一系列治疗应用,以例如促进血管形成和 /或血管生成。

[0002] 发明背景

[0003] 血管生成素属于血管生长因子家族,血管生长因子在胚胎和出生 后血管生成中起作用。Ang1促进内皮细胞和一些非内皮细胞(例如平 滑肌细胞)的迁移。Ang1还诱导内皮细胞萌发和重新组织到小管中。Ang1对内皮细胞发挥有效的消炎作用,遏制血管内皮生长因子 (VEGF) 诱发的E-选择素、ICAM-1和VCAM-1上调,并抑制回应于 VEGF和TNF- α 的白细胞附着和迁移(Kim等人2001a)。

[0004] 许多研究已经表明,Ang1的过度表达或补充Ang1的添加在减 轻局部缺血和恢复包括四肢、脑部、关节、肾和最显著地心脏在内的 若干器官的功能方面具有有益的作用。其它有益的作用包括减轻血栓 (Kim等人2001b)。因此,Ang1展现出大量将暗示其用作心血管疾 病治疗剂的效用的重要特性。

[0005] 在功能性血管系统的发育所需的生长因子级联中,Ang1和VEGF 发挥重要作用。因此,对于缺血性心肌治疗中的治疗性血管形成, Ang1与VEGF组合使用也被视为一种非常有希望的候选疗法。

[0006] 以前,Ang1与VEGF-A组合施用到测试动物中的心肌梗塞或周 围梗塞区域中显示增加新血管形成并减少心肌细胞凋亡,引起注射部 位的心肌细胞再生增加,而且改善血管灌注和心脏功能。次最大剂量 的约20:1比率的Ang1和VEGF加强这些作用,并比单独任一因子更 有效(Chae等人2000)。这些结果表明Ang1与VEGF组合治疗可以用 于产生治疗性血管形成。

[0007] 近来,干细胞疗法已经显现为缺血性心脏病的潜在治疗之一 (Huang等人2011; Li jie等人2007)。

[0008] 由于在许多类型的干细胞中血管生成因子的表达不足,所以单独 干细胞用于促进血管生成仍然受限。涉及用编码Ang1的核酸分子转 染干细胞的干细胞遗传修饰已经用以解决此限制。然而,由于技术复 杂且遗传修饰过程引起可能不合需要的作用,所以使用 经遗传修饰的 干细胞具有其缺点。

发明概要

[0009] 本公开是基于表达高水平Ang1的干细胞群体的意外产生,不需 要用表达Ang1的核酸转染细胞。在一个实例中,此干细胞群体还表 达低水平VEGF,且所产生的Ang1:VEGF的比率与Chae等人 (2000) 所示的特别有效地加强血管形成的比率一致。

[0010] 因此,本公开提供了一种组合物,其包含未遗传修饰的干细胞, 其中所述未遗传修饰的干细胞表达至少0.1 μ g/ 10^6 个细胞的量的 Ang1。

[0011] 在另一实例中,组合物包含表达至少0.5 μ g/ 10^6 个细胞的量的 Ang1的干细胞。在另一实例中,干细胞表达至少0.7 μ g/ 10^6 个细胞的 量的Ang1。在另一实例中,干细胞表达至

少 $1\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的 Ang1。

[0012] 在另一实例中,干细胞表达少于约 $0.05\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的 VEGF。在另一实例中,干细胞表达少于约 $0.03\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的 VEGF。在另一实例中,干细胞表达少于约 $0.02\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的 VEGF。

[0013] 在另一实例中,未遗传修饰的干细胞表达至少约2:1比率的 Ang1:VEGF。在另一实例中,未遗传修饰的干细胞表达至少约10:1 比率的Ang1:VEGF。在另一实例中,未遗传修饰的干细胞表达至少 约20:1比率的Ang1:VEGF。在另一实例中,未遗传修饰的干 细胞表达至少约50:1比率的 Ang1:VEGF。

[0014] 在另一实例中,干细胞是间质干细胞。在另一实例中,干细胞是 间质前驱细胞。在另一实例中,干细胞来源于诱导的多能干细胞(iPS 细胞)。

[0015] 在另一实例中,组合物进一步包含可接受的药物载剂。

[0016] 在另一实例中,通过根据下述方法培养未遗传修饰的干细胞,产 生组合物。

[0017] 本公开还提供了一种用于诱导干细胞中Ang1表达的体外方法, 所述方法包括:在细胞培养基中培养干细胞群体,其中所述细胞培养 基:

[0018] • 含有短效L-抗坏血酸衍生物,但不含有大量的长效L-抗坏血 酸衍生物;和/或

[0019] • 补充少于10%v/v胎牛血清。

[0020] 本公开还提供了一种用于诱导干细胞中Ang1表达的体外方法, 所述方法包括:在细胞培养基中培养干细胞群体,其中所述细胞培养 基:

[0021] • 含有短效L-抗坏血酸衍生物,但不含有大量的长效L-抗坏血 酸衍生物;和/或

[0022] • 补充少于10%v/v胎牛血清;和/或

[0023] • 补充非胎儿血清。

[0024] 在一个实例中,以上方法进一步包括测量Ang1水平以确定诱导 Ang1表达。在另一实例中,当干细胞表达至少 $0.5\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量 的Ang1时,诱导Ang1表达。在另一实例中,当干细胞表达至少 $0.7 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的Ang1时,诱导Ang1表达。在另一实例中,当干细胞表达至少 $1\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的Ang1时,诱导Ang1表达。

[0025] 在一个实例中,以上方法进一步包括选择具有诱导的Ang1表达 的细胞。在一个实例中,选择表达至少 $0.5\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的Ang1 的细胞。在另一实例中,选择表达至少 $0.7\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的Ang1 的细胞。在另一实例中,选择表达至少 $1\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的 Ang1 的细胞。

[0026] 在一个实例中,所述方法进一步包括测量Ang1水平以确定诱导 Ang1表达并选择 具有诱导的Ang1表达的细胞。

[0027] 在一个实例中,短效抗坏血酸衍生物为L-抗坏血酸盐。

[0028] 在一个实例中,短效抗坏血酸衍生物为L-抗坏血酸钠盐。

[0029] 在一个实例中,细胞培养基补充少于10%v/v胎牛血清(FCS)。

[0030] 在一个实例中,细胞培养基补充少于8%v/v胎牛血清(FCS)。

[0031] 在一个实例中,细胞培养基补充少于7%v/v胎牛血清(FCS)。

[0032] 在一个实例中,细胞培养基补充少于6%v/v胎牛血清(FCS)。

[0033] 在一个实例中,细胞培养基补充少于5%v/v胎牛血清。

- [0034] 在一个实例中,细胞培养基补充一种或多种选自由以下组成的组 的刺激因子:1 α ,25-二羟基维生素D3(1,25D)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和基质衍生因子1 α (SDF-1 α)。
- [0035] 在一个实例中,细胞培养基补充非胎儿血清。
- [0036] 在一个实例中,细胞培养基补充哺乳动物非胎儿血清。
- [0037] 在一个实例中,细胞培养基补充人类非胎儿血清。
- [0038] 在一个实例中,细胞培养基补充新生血清。
- [0039] 在一个实例中,细胞培养基补充哺乳动物新生血清。
- [0040] 在一个实例中,细胞培养基补充新生牛血清(NBCS)。
- [0041] 在一个实例中,细胞培养基补充人类新生血清。
- [0042] 在一个实例中,细胞培养基补充从脐带血获得的人类新生血清。
- [0043] 在另一实例中,细胞培养基补充成年血清。
- [0044] 在一个实例中,细胞培养基补充哺乳动物成年血清。
- [0045] 在一个实例中,细胞培养基补充成年牛血清。
- [0046] 在一个实例中,细胞培养基补充成人血清。
- [0047] 在一个实例中,细胞培养基补充人类AB血清。
- [0048] 在另一实例中,细胞培养基补充至少约5%v/v NBCS。
- [0049] 在另一实例中,细胞培养基补充至少约2%v/v NBCS。
- [0050] 在一个实例中,细胞培养基补充NBCS与FCS的混合物。举例来说,NBCS与FCS的比率可以是约1:1。
- [0051] 在一个实例中,细胞培养基补充至少约5%v/v FCS和至少约5% v/v NBCS。
- [0052] 在一个实例中,细胞培养基不补充胎儿血清。
- [0053] 本公开还提供了一种获得适用于促进血管形成和/或血管生成的未遗传修饰的干细胞的方法,其包括:从至少一个供体获得包括干细胞的至少一个细胞群体;培养所述干细胞;确定所述至少一个细胞群体每一者中所述干细胞表达的Ang1的量;以及选择表达至少0.1 μ g/ 10^6 个细胞的量的Ang1的干细胞。
- [0054] 在一个实例中,所述方法进一步包括确定所述至少一个细胞群体每一者中干细胞表达的VEGF的量;以及选择表达至少2:1比率或至少10:1比率或至少20:1比率或至少30:1比率或至少50:1比率的Ang1:VEGF的干细胞。
- [0055] 本公开还提供了本文所述的组合物的用途,其用于促进血管形成和/或血管生成。本公开还提供了本文所述的组合物的用途,其用作抗血栓形成剂。本公开还提供了本文所述的组合物的用途,其用于治疗其中需要增加Ang1表达的病状。
- [0056] 本公开还提供了一种用于促进受试者中血管形成和/或血管生成的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的组合物。本公开还提供了一种用于减少受试者中血栓形成的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的组合物。本公开还提供了一种用于治疗受试者的其中需要增加Ang1表达的病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的组合物。
- [0057] 本公开还提供了本文所述的组合物的用途,其用于制造供促进血管形成和/或血管生成用的药物。本公开还提供了本文所述的组合物的用途,其用于制造供减少血栓形成

用的药物。本公开还提供了本文所述的组合物的用途，其用于制造供治疗其中需要增加 Ang1表达的病状用的药物。

[0058] 本公开描述的干细胞可以从任何哺乳动物获得。举例来说，干细胞可以来源于灵长类动物、奶牛、绵羊、马、犬、猫或山羊。在一个实例中，干细胞是人类干细胞。

[0059] 在另一实例中，本公开涉及根据本公开的方法培养或通过本公开的方法获得的干细胞群体。

[0060] 在另一实例中，本公开的方法用于制造供促进血管形成和/或血管生成用的药物。

[0061] 在另一实例中，本公开的方法用于制造供治疗其中需要增加 Ang1表达的病状用的药物。

[0062] 图示简单说明

[0063] 图1：在过程A和过程B下的MPC生长。Y轴指示细胞数目；X轴是时间，以天为单位。

[0064] 图2：在过程A和过程B下的MPC倍增时间。细胞从P3传代到P5。

[0065] 图3：在过程A和过程B下的MPC的群体倍增时间 (PDL)。MPC 从P3生长到P5。在过程A下生长的MPC进行8个PDL且在过程B下生长的MPC进行7.33个PDL。

[0066] 发明详述

[0067] 通用技术和定义

[0068] 本说明书通篇中，除非以其它方式特别陈述或上下文另外要求，否则对单个步骤、目标组合物、步骤组或目标组合物组的提及应涵盖那些步骤、目标组合物、步骤组或目标组合物组的一个和多个(即一个或多个)。

[0069] 本领域技术人员将了解本文中描述的公开内容可以进行除特别描述内容以外的变化和修改。应了解本公开包括所有这类变化和修改。本公开还包括所有在本说明书中个别或共同提及或指示的步骤、特征、组合物和化合物，以及所述步骤或特征的任何和所有组合或任两个或超过两个所述步骤或特征。

[0070] 本公开在范围上不受本文所述的特定实施方案限制，这些实施方案仅仅是为了示例而已。功能同等的产物、组合物和方法清楚地在如本文中描述的公开内容的范围内。

[0071] 除非另外特别陈述，否则本文公开的任何实例作必要修改后应适用于任何其它实例。

[0072] 除非另外特别定义，否则本文中使用的所有技术和科学名词都应具有与本领域(例如细胞培养、分子遗传学、干细胞分化、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学中)技术人员通常所了解相同的含义。

[0073] 除非另外指明，否则本公开中利用的干细胞、细胞培养和免疫技术是本领域技术人员众所周知的标准程序。此类技术在例如以下等来源中文献通篇中加以描述和解释：J.Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J.Sambrook等人, Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989) ;T.A.Brown(编辑), Essential Molecular Biology:A Practical Approach, 第1和2卷, IRL Press (1991) , D.M. Glover和B.D.Hames(编辑)；以及 F.M.Ausubel等人(编辑), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括所有更新, 直至现在) ;Ed Harlow和

David Lane (编辑) Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory , (1988) ;以及J.E.Coligan等人(编辑) Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons (包括所有更新,直至现在)。

[0074] 应了解术语“和/或”，例如“X和/或Y”意指“X和Y”或“X或Y”，且应清楚证明两种含义或者任一含义。

[0075] 如本文所用,除非相反陈述,否则术语约是指指定值+/-10%,更 优选地+/-5%。

[0076] 体积百分比(v/v%)定义[(溶质体积)/(溶液体积)]×100%。体积百分比是相对于溶液体积。举例来说,补充5%v/v FCS的细胞培养基 意指每100ml细胞培养基存在约5ml FCS。

[0077] 本说明书通篇中,应了解词语“包含(comprise)”或例如“包含 (comprises)”或“包含(comprising)”意味包括所述要素、整数或步骤，或者要素、整数或步骤组,但不排除任何其它要素、整数或步骤,或 要素、整数或步骤组。

[0078] 干细胞

[0079] 如本文所用,术语“干细胞”是指能够产生表型和基因型一致的子 代以及至少一种其它最终细胞类型(例如终末分化的细胞)的自我更 新细胞。术语“干细胞”包括全能细胞、多能细胞和多潜能细胞以及来 源于其分化的祖细胞和/或前驱细胞。干细胞可以是成年或胚胎干细 胞。

[0080] 如本文所用,术语“全能细胞(totipotent cell)”或“全能细胞 (totipotential cell)”是指能够形成完整胚胎的细胞(例如胚泡)。

[0081] 如本文所用,术语“多能细胞(pluripotent cell)”或“多能细胞 (pluripotential cell)”是指具有完整的分化多样性,即能够生长成哺乳 动物身体大约 260种细胞类型任一者的细胞。多能细胞可以自我更 新,且可保持在组织内休眠或静止。

[0082] “多潜能细胞(multipotent cell)”或“多潜能细胞(multipotent cell)”意指能够产生若干成熟细胞类型任一者的细胞。如本文所用,此短语涵盖成年祖细胞和这些细胞的多潜能子代。不同于多能细胞, 多潜能细胞不能够形成所有细胞类型。

[0083] 如本文所用,术语“间质谱系前驱细胞或干细胞”是指可以分化成 间质细胞类型的细胞。举例来说,间质谱系前驱细胞和间质前驱细胞 可以分化成骨骼、软骨、肌肉和脂肪 细胞以及纤维结缔组织。

[0084] 在一个实例中,本公开的干细胞是STRO-1+间质前驱细胞。

[0085] STRO-1+多潜能细胞是在骨髓、血液、牙髓、脂肪组织、皮肤、脾、胰腺、脑、肾、肝、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、淋巴结、胸腺、骨骼、韧带、腱、骨骼肌、真皮和骨膜中发现的细胞。因此, STRO-1+多潜能细胞能够分化成大量细胞类型,包括(但不限于)脂肪、骨、软骨、弹性和纤维结缔组织。这些细胞进入的特定谱系定型和分 化途径取决于来自机械影响的多种影响和/或内源性生物活性因子, 例如生长因子、细胞因子和/或宿主组织建立的局部微环境条件。在 一个实施方案中,STRO-1+多潜能细胞是非造血祖细胞,其分裂产生 子细胞,这些子细胞是干细胞或者是将按期不可逆地分化产生表型细 胞的前驱细胞。

[0086] 在一个实例中,STRO-1+细胞从获自受试者(例如有待治疗的受 试者或相关受试者或无关受试者(无论是相同物种还是不同)的样品 富集。术语“富集(enriched)”、“富集(enrichment)”或其变化形式在本文 中用以描述当与未处理的细胞群体(例如天然环境中

的细胞)比较时,一种特定细胞类型的比例或大量特定细胞类型的比例增加的细胞群体。在一个实例中,STRO-1+细胞富集的群体包含至少约0.1%或0.5%或1%或2%或5%或10%或15%或20%或25%或30%或50%或75%或85%或95%或99%STRO-1+细胞。关于此,术语“STRO-1+细胞富集的细胞群体”将清楚地证明术语“包含X%STRO-1+细胞的细胞群体”,其中X%是如本文中叙述的百分比。在一些实例中,STRO-1+细胞可以形成克隆源性群落,例如CFU-F(成纤维细胞)或其子集(例如50%或60%或70%或80%或90%或95%)可以具有此活性。

[0087] 在一个实例中,本公开的干细胞从包含STRO-1+细胞的细胞制剂以可选择形式富集。关于此,应了解术语“可选择形式”意指细胞表达标记物(例如细胞表面标记物),从而允许选择STRO-1+细胞。标记物可以是STRO-1,但无须是STRO-1。举例来说,如本文中描述和/或例示,表达STRO-2和/或STRO-3(TNAP)和/或STRO-4和/或VCAM-1和/或CD146和/或3G5的细胞(例如MPC)还表达STRO-1(且可以是STRO-1^亮)。因此,指示细胞是STRO-1+并不意指通过STRO-1表达选择细胞。在一个实例中,基于至少STRO-3表达,例如其是STRO-3+(TNAP+),来选择细胞。在另一实例中,基于至少STRO-4表达,例如其是STRO-4+,来选择细胞。

[0088] 提及细胞或其群体的选择不一定要求从特定的组织来源选择。如本文所述,STRO-1+细胞可以从各种来源选择或分离或富集。也就是说,在一些实例中,这些术语支持从包含STRO-1+细胞的任何组织(例如MPC)或血管化组织或包含外膜细胞(例如STRO-1+外膜细胞)的组织或本文中叙述的任一种或多种组织选择。

[0089] 在一个实例中,本公开的干细胞表达一种或多种个别或共同选自由以下组成的组的标记物:STRO-1+、TNAP+、VCAM-1+、THY-1+、STRO-2+、STRO-4+(HSP-90 β)、CD45+、CD146+、3G5+、CC9或其任何组合。

[0090] “个别”意指本公开分别涵盖叙述的标记物或标记物组,且尽管个别标记物或标记物组可能在本文中未分别列出,但随附权利要求书可分别且彼此区别地定义此类标记物或标记物组。

[0091] “共同”意指本公开涵盖任何数目的叙述的标记物或肽组或其组合,且尽管此类数目的标记物或标记物组或其组合可能在本文中未特别列出,但随附权利要求书可分别且与标记物或标记物组的任何其它组合相区别地定义此类组合或亚组合。

[0092] 在一个实例中,STRO-1+细胞是STRO-1^亮(同义词STRO-1^{bri})。在一个实例中,STRO-1^{bri}细胞相对于STRO-1^暗或STRO-1^{中间}细胞优先富集。

[0093] 在一个实例中,STRO-1^亮细胞另外是TNAP+、VCAM-1+、THY-1+、STRO-2+、STRO-4+(HSP-90 β)和/或CD146+中的一个或多个。举例来说,针对上述标记物的一个或多个,选择细胞,和/或选择展示表达上述标记物中的一个或多个的细胞。关于此,展示表达标记物的细胞无须特别测试,而是可以测试以前富集或分离的细胞,且随后使用、分离或富集的细胞可以合理地假设成也表达相同的标记物。

[0094] 在一个实例中,STRO-1^亮通过免疫选择来分离。在一个实例中,STRO-1^亮细胞通过表达TNAP的细胞的免疫选择来分离。如本文所用,术语“TNAP”意图涵盖组织非特异性碱性磷酸酶的所有同功异型物。举例来说,该术语涵盖肝同功异型物(LAP)、骨骼同功异型物(BAP)和肾同功异型物(KAP)。在一个实例中,TNAP是BAP。在一个实例中,如本文所用,

TNAP是指可以结合由融合瘤细胞系产生的STRO-3 抗体的分子,STRO-3抗体依据布达佩斯条约(the Budapest Treaty)的 条款以寄存编号PTA-7282于2005年12月19日寄存在ATCC。

[0095] 在一个实例中,间质前驱细胞或干细胞是CD29+、CD54+、 CD73+、CD90+、CD102+、CD105+、CD106+、CD166+、MHC1+ 间质干细胞(例如remestemcel-L)。

[0096] 在一个实例中,间质前驱细胞是如WO 2004/85630中定义的血 管周间质前驱细胞。举例来说,间质前驱细胞表达血管周细胞的标记 物,例如细胞是STRO-1+或STRO-1^亮和/或3G5+。在一个实例中, 细胞是或以前是从血管化组织或器官或其部分分离的细胞或其子代。

[0097] 称为对既定标记物呈“阳性”的细胞可以表达低 (lo或暗) 或高 (亮、 bri) 水平的该标记物,取决于细胞表面上标记物存在的程度,其中所 述术语涉及荧光强度或者用于细胞分类过程中的其它标记物。在所分 类的特定细胞群体上使用的标记物的上下文中将了解 lo (或暗或暗淡) 与bri的区别。称为对既定标记物呈“阴性”的细胞不一定完全缺乏该 细胞。此术语意指该细胞表达相对极低水平的所述标记物,且当可检 测地标记或超过背景水 平,例如使用同型对照抗体检测的水平而不可 检测时,其产生极低信号。

[0098] 当本文中使用时,术语“亮”是指细胞表面上在可检测地标记时产 生相对高信号的标记物。虽然不希望受理论限制,但提出“亮”细胞表 达的目标标记物蛋白质(例如由STRO-1识别的抗原)比样品中其它细 胞多。举例来说,当用FITC结合的STRO-1抗体标记时,如荧光活 化细胞分类(FACS) 分析所测定,STRO-1^{bri} 细胞产生的荧光信号比非 亮细胞(STRO-1^{暗/暗})大。在一个实例中,“亮”细胞构成起始样品中所 含的最亮标记的骨髓单核细胞的至少约0.1%。在其它实例中,“亮” 细胞构成起始样品中所含的最亮标记的骨髓单核细胞的至少约 0.1%、至少约0.5%、至少约1%、至少约1.5%或至少约2%。在一个 实例中,STRO-1^亮细胞相对于“背景”,即STRO-1-细胞,具有21og 量值更高的STRO-1表面表达。比较起来,STRO-1^{暗淡}和/或STRO-1^{中间}细胞相对于“背景”具有少于21og量值更高的STRO-1表面表达, 通常约11og或更少。

[0099] 在一个实例中,显著比例的STRO-1+多潜能细胞能够分化成至 少两种不同的生殖系。多潜能细胞可以定型的谱系的非限制性实例包 括骨骼前驱细胞;对胆管上皮细胞和肝 细胞是多潜能的肝细胞祖细 胞;神经限制细胞,其可以产生进展成少突神经胶质细胞和星 形细胞 的胶质细胞前驱物;进展成神经元的神经元前驱物;心肌和心肌细胞 的前驱物,葡萄糖反应性分泌胰岛素的胰腺β-细胞系。其它谱系包括 (但不限于)成牙质细胞、产生牙质 的细胞和软骨细胞以及以下前驱细 胞:视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、例如角化细胞 等皮肤细胞、树突状细胞、毛囊细胞、输尿管上皮细胞、平滑肌和骨骼肌细胞、睾 丸祖细 胞、血管内皮细胞、腱、韧带、软骨、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质、心肌、平滑肌、骨骼 肌、外膜细胞、血管细胞、上皮细胞、神经胶质细胞、神经元细胞、星形细胞和少突神经胶质 细胞。

[0100] 在另一实例中,STRO-1+细胞不能在培养时产生造血细胞。

[0101] 在一个实例中,目前描述的干细胞是间质干细胞。间质干细胞 (MSC) 可以是均质 组合物或可以是MSC富集的混合细胞群体。均质 间质干细胞组合物可以通过培养附着骨髓 或骨膜细胞来获得,且间质 干细胞可以通过用独特的单克隆抗体鉴别的特定细胞表面标 记物来 鉴别。用于获得间质干细胞富集的细胞群体的方法描述于例如美国专 利No 5,

486,359中。间质干细胞的替代来源包括(但不限于)血液、皮肤、脐带血、肌肉、脂肪、骨骼和软骨膜。

[0102] 可以通过大量不同的方法实现携带上述细胞表面标记物的干细胞的识别、选择和纯化。举例来说,结合剂施加于相关标记物,接着分离展现结合,高水平结合或低水平结合或无结合的那些细胞。

[0103] 举例来说,结合剂可以包括抗体,例如单克隆抗体或基于抗体的分子。

[0104] 抗体和其它结合分子可以用于多种技术中,以选择和纯化表达特定细胞表面标记物的干细胞。

[0105] 用于选择和纯化的技术可包括(但不限于)使用抗体涂布的磁珠进行磁力分离、亲和层析法和用附接于固体基质的抗体“淘洗”、荧光活化细胞分类(FACS)。

[0106] 表达特定标记物的本公开的干细胞可以经由阳性免疫选择从细胞群体选择或纯化。举例来说,间质前驱细胞可以基于STRO-1抗体的细胞表面表达,从细胞群体分离和富集(参见例如Gronthos和Simmons 1995)。

[0107] 根据本公开的分离的干细胞可以通过培养而体外扩增。如本领域技术人员所了解,干细胞可以低温保存,解冻,并随后通过培养而体外扩增。在一个实例中,将干细胞接种在生长培养基中,并使其附着培养容器,在37°C、20%O₂下过夜。随后替换生长培养基并将细胞在37°C、5%O₂下再培养68至72小时。

[0108] 在一个实例中,将分离的干细胞以50,000个细胞/平方厘米接种在补充血清的生长培养基中,并使其附着培养容器,在37°C、20%O₂下过夜。随后用补充有0.5%牛血清白蛋白(BSA)的软骨形成基础培养基(CBM;Lonza,Walkersville,MD)替换生长培养基并将细胞在37°C、5%O₂下再培养68至72小时。

[0109] 本领域中已知初级干细胞培养的多种其它方法。举例来说,可以使用Gronthos和Simmons 1995中描述的方法进行初级干细胞培养。

[0110] 培养的干细胞表型上不同于体内细胞。其可以表达例如CD44。

[0111] 在一个实施方案中,培养的干细胞在生物学上不同于体内细胞,具有较高的再生速率。

[0112] 培养的干细胞可以在施用于受试者前低温保存。举例来说,间质谱系前驱细胞可以在施用于受试者前低温保存。

[0113] 未遗传修饰的细胞

[0114] 如本文所用,术语“未遗传修饰”是指没有通过用表达或编码Ang1的核酸转染而修饰的细胞。为了避免引起怀疑,在本公开的上下文中,用编码Ang1的核酸转染的干细胞将视为经遗传修饰。在本公开的上下文中,“未遗传修饰”的细胞在某种程度上天然地表达Ang1,未用编码Ang1的核酸转染。

[0115] Ang1和/或VEGF的表达

[0116] 本公开的干细胞未经遗传修饰并表达至少0.1μg/10⁶个细胞的量的Ang1。然而,在不同的实施方案中,设想本公开的干细胞可以表达至少0.2μg/10⁶个细胞、0.3μg/10⁶个细胞、0.4μg/10⁶个细胞、0.5 μg/10⁶个细胞、0.6μg/10⁶个细胞、0.7μg/10⁶个细胞、0.8μg/10⁶个细胞、0.9μg/10⁶个细胞、1μg/10⁶个细胞、1.1μg/10⁶个细胞、1.2μg/10⁶个细胞、1.3μg/10⁶个细胞、1.4μg/10⁶个细胞、1.5μg/10⁶个细胞的量的Ang1。

[0117] 在另一方面,本公开的未遗传修饰的干细胞表达少于约 $0.05\text{ }\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的VEGF。然而,在不同的实施方案中,设想本公开的干细胞可以表达少于约 $0.05\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.04\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.03\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.02\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.01\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.009\text{ }\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.008\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.007\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.006\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.005\text{ }\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.004\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.003\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.002\mu\text{g}/10^6$ 个细胞、 $0.001\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的VEGF。

[0118] 在干细胞的组合物或培养物中表达的细胞Ang1和/或VEGF的量 可以通过本领域技术人员已知的方法测定。此类方法包括(但不限于) 定量分析法,例如定量ELISA分析法。然而,应了解本公开的范围 不限于用于测定在本公开的干细胞中表达的Ang1或VEGF的量或水 平的任何特定方法。

[0119] 在一个实例中,干细胞的组合物或培养物表达的Ang1或VEGF 的水平由ELISA分析法测定。在此类分析法中,将来自干细胞培养 物的细胞溶解产物添加到ELISA板的孔中。孔可以用针对Ang1或 VEGF的初级抗体(单克隆或多克隆抗体)涂布。接着洗涤孔,接着与 针对初级抗体的二级抗体(单克隆或多克隆抗体)接触。二级抗体结合 于适当的酶,例如辣根过氧化酶。接着可以培育孔,接着在培育期后 洗涤。接着孔与结合于二级抗体的酶的适当底物(例如一种或多种色 原)接触。可以采用的色原包括(但不限于)过氧化氢和四甲基联苯胺。添加底物后,将孔培育适当时间。培育结束后,将“中止”溶液添加到 孔中以中止酶与底物的反应。接着测量样品的光密度(OD)。样品的光 密度与含有已知量的Ang1或VEGF的样品的光密度相关,以确定测 试的干细胞培养物表达的Ang1或VEGF的量。

[0120] 在另一方面,本公开的未遗传修饰的干细胞表达至少约2:1比率 的Ang1:VEGF。然而,在不同的实施方案中,设想本公开的干细胞 可以表达至少约10:1、15:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、 26:1、27:1、28:1、29:1、30:1、31:1、32:1、33:1、34:1、35:1、50:1比率的Ang1:VEGF。

[0121] 本领域技术人员将显而易见用于确定Ang1:VEGF表达比率的方 法。在确定Ang1与 VEGF表达比率的方法的一个实例中,Ang1和 VEGF表达水平经由如以上所讨论的定量ELISA 定量。在此类实例 中,在定量Ang1和VEGF的水平后,基于Ang1和VEGF的定量水 平的比率可以表示为: (Ang1水平/VEGF水平)=Ang1:VEGF比率。

[0122] 细胞组合物

[0123] 在本公开的一个实例中,干细胞呈组合物形式施用。在一个实例 中,此类组合物 包含药学上可接受的载剂和/或赋形剂。

[0124] 术语“载剂”和“赋形剂”是指通常用于本领域中,以促进活性化合 物的存储、施用 和/或生物活性的物质组合物(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版, Mac Publishing Company (1980))。载剂也可以减少活性化合物的任何不合需要的副作用。适合的载剂是 例如稳定的,例如不能与载剂中其它成分反应。在一个实例中,在治 疗采用的剂量和浓度下载剂在接受者中不会产生显著的局部或全身 副作用。

[0125] 适用于本公开的载剂包括通常使用的载剂,例如生理盐水、右旋 糖水溶液、乳糖、林格氏溶液(Ringer's solution)、缓冲溶液、透明质 烷和二醇是示例性液体载剂,特别是 (等张时) 用于溶液。适合的药物 载剂和赋形剂包括淀粉、纤维素、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻谷、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、甘油、丙

二醇、水、乙醇等等。

[0126] 在另一实例中，载剂是例如其中细胞生长或悬浮的培养基组合物。举例来说，此类培养基组合物不会在其施用的受试者中诱发任何副作用。

[0127] 示例性载剂和赋形剂不会不利地影响细胞的存活力和/或细胞减轻、预防或延迟代谢综合症和/或肥胖症的能力。

[0128] 在一个实例中，载剂或赋形剂提供缓冲活性以将细胞和/或可溶性因子维持在适合的pH值下，从而发挥生物活性，例如载剂或赋形剂是磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)。PBS代表一种有吸引力的载剂或赋形剂，因为其与细胞和因子最低限度地相互作用且允许细胞和因子快速地释放，在这种情况下，本公开的组合物可以呈液体产生，例如通过注射直接施加到血流或组织或组织周围或附近的区域中。

[0129] 干细胞和/或其子代细胞也可以并入或埋入与接受者相容并降解成对接受者无害的产物的支架内。这些支架为待移植到受试者中的细胞提供了支持和保护。天然和/或合成的生物可降解支架是此类支架的实例。

[0130] 多种不同的支架可以成功用于本公开的实施中。示例性支架包括(但不限于)生物可降解支架。天然的生物可降解支架包括胶原蛋白、纤维结合蛋白和层粘连蛋白支架。用于细胞移植支架的适合合成材料应能支持大规模细胞生长和细胞功能。此类支架也可以是可再吸收的。适合的支架包括聚乙醇酸支架，例如Vacanti等人，J.Ped.Surg. 23:3-9 1988；Cima等人，Biotechnol.Bioeng. 38:145 1991；Vacanti等人，Plast.Reconstr.Surg.88:753-9 1991所述；或合成聚合物，例如聚酸酐、聚原酸酯和聚乳酸。

[0131] 在另一实例中，细胞可以在凝胶支架(例如来自Upjohn Company 的Gelfoam)中施用。

[0132] 本文所述的细胞组合物可以单独或呈与其它细胞的混合物施用。不同类型的细胞可以在临施用前或施用后立即与本公开的组合物混合，或其可以在施用前一起共培养一段时间。

[0133] 在一个实例中，组合物包含有效量或治疗或预防有效量的细胞。举例来说，组合物包含约 1×10^5 个具有升高Ang1水平的干细胞至约 1×10^7 个具有升高Ang1水平的干细胞或约 1×10^6 个干细胞至约 5×10^6 个干细胞/公斤。待施用的细胞的确切量取决于多种因子，包括受试者的年龄、体重和性别，以及所治疗的病症的程度和严重程度。

[0134] 在一个实例中，低剂量的细胞施用于受试者。示例性剂量包括约 0.1×10^4 至约 0.5×10^6 个细胞/公斤之间，例如约 0.1×10^5 至约 0.5×10^6 个细胞/公斤之间，例如约 0.5×10^5 至约 0.5×10^6 个细胞/公斤之间，例如约 0.1×10^6 至约 0.5×10^6 个细胞/公斤之间，例如约 0.2×10^6 或 0.3×10^6 或 0.4×10^6 个细胞/公斤。

[0135] 在一个实例中，高剂量的细胞施用于受试者。示例性剂量包括至少约 1.5×10^6 个细胞/公斤。举例来说，高剂量包含约 1.5×10^6 至约 6×10^6 个细胞/公斤之间，例如约 1.5×10^6 至约 5×10^6 个细胞/公斤之间，例如约 1.5×10^6 至约 4×10^6 个细胞/公斤之间，例如约 1.5×10^6 至约 3×10^6 个细胞/公斤之间。举例来说，高剂量包含约 1.5×10^6 或约 2×10^6 个细胞/公斤。

[0136] 其它示例性剂量包括至少约 1×10^6 个细胞。举例来说，剂量可包含约 1.0×10^6 至

约 1×10^{10} 个细胞之间,例如约 1.1×10^6 至约 1×10^9 个细胞之间,例如约 1.2×10^6 至约 1×10^8 个细胞之间,例如约 1.3×10^6 至约 1×10^7 个细胞之间,例如约 1.4×10^6 至约 9×10^6 个细胞之间,例如约 1.5×10^6 至约 8×10^6 个细胞之间,例如约 1.6×10^6 至约 7×10^6 个细胞之间,例如约 1.7×10^6 至约 6×10^6 个细胞之间,例如约 1.8×10^6 至约 5×10^6 个细胞之间,例如约 1.9×10^6 至约 4×10^6 个细胞之间,例如约 2×10^6 至约 3×10^6 个细胞之间。

[0137] 在一个实例中,剂量包含约 5×10^5 至 2×10^7 个细胞之间,例如约 6×10^6 个细胞至约 1.8×10^7 个细胞之间。剂量可以是例如约 6×10^6 个细胞或约 1.8×10^7 个细胞。

[0138] 间质谱系前驱细胞或干细胞占组合物细胞群体的至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%。

[0139] 在一些实例中,细胞容纳在一腔室内,该腔室不允许细胞离开到受试者循环中,然而,允许细胞分泌的因子进入循环。以此方式,可溶性因子可以通过允许细胞分泌因子到受试者循环中而施用于受试者。此类腔室可以同等地植入受试者中的部位以增加例如植入心脏中或心脏附近的可溶性因子的局部水平。

[0140] 本公开的干细胞以有效治疗动物的疾病或病症的量施用于动物。动物可以是哺乳动物,且哺乳动物可以是灵长类动物,包括人类和非人类灵长类动物。干细胞可以全身施用,例如通过静脉内、动脉内或腹膜内施用。待施用的干细胞的确切剂量取决于多种因子,包括(但不限于)患者的年龄、体重和性别、所治疗的病症或病症以及其程度和严重程度。

[0141] 包含本公开的干细胞的组合物可以低温保存。干细胞的低温保存可以使用本领域中已知的慢速冷却法或‘快速’冷冻方案进行。优选地,与解冻细胞相比,低温保存方法维持低温保存细胞类似的表型、细胞表面标记物和生长速率。

[0142] 低温保存的组合物可以包含低温保存溶液。低温保存溶液的pH值通常是6.5至8,优选地,7.4。

[0143] 低温保存溶液可以包含无菌的非热性等张溶液,例如PlasmaLyte A®。100mL PlasmaLyte A®含有526mg氯化钠USP (NaCl);502mg葡萄糖酸钠($C_6H_{11}NaO_7$);368mg三水合乙酸钠USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$);37mg氯化钾USP (KCl);和30mg氯化镁USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)。其不含抗微生物剂。用氢氧化钠调整pH值。pH值是7.4(6.5至8.0)。

[0144] 为了促进冷冻,通常将例如二甲亚砜(DMSO)等低温保护剂添加到低温保存溶液。理想地,低温保护剂应对细胞和患者来说是无毒的,非抗原性、化学惰性,在解冻后存活率高并允许在不洗涤下移植。然而,最常使用的低温防护剂DMSO展示一定细胞毒性。羟乙基淀粉(HES)可以用作DMSO的替代品或与DMSO组合,以降低低温保存溶液的细胞毒性。

[0145] 低温保存溶液可以包含DMSO、羟乙基淀粉、人类血清组分和其他蛋白质填充剂中的一者或多者。在一个实例中,低温保存的溶液包含约5%人类血清白蛋白(HSA)和约10%DMSO。低温保存溶液可以进一步包含甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)和海藻糖中的一者或多者。

[0146] 低温保存的组合物可以解冻并直接施用于受试者。或者,低温保存的组合物可以解冻并在施用前使间质谱系前驱细胞或干细胞再悬浮于替代溶液中。

[0147] 细胞培养方法

[0148] 本公开的组合物可以经由多种细胞培养方法产生。

[0149] 因此,本公开还提供了用于诱导干细胞中Ang1表达的体外方法。意外地,本发明人已经鉴别出在干细胞中诱导Ang1表达的细胞培养 基条件。还发现这些条件减少VEGF表达并诱导ANG1:VEGF比率 升高。

[0150] 举例来说,这些条件包括在细胞培养基中培养干细胞群体,其中 所述细胞培养基含有:

[0151] i) 短效L-抗坏血酸衍生物,但不含有大量的长效L-抗坏血酸衍 生物;和/或

[0152] ii) 少于10%v/v胎牛血清。

[0153] 在另一实例中,这些条件包括在细胞培养基中培养干细胞群体, 其中所述细胞培养基含有:

[0154] i) 短效L-抗坏血酸衍生物,但不含有大量的长效L-抗坏血酸衍 生物;

[0155] ii) 少于10%v/v胎牛血清;和/或

[0156] iii) 非胎儿血清。

[0157] 因此,在一个实施方案中,本公开涉及一种用于诱导干细胞中 Ang1表达的体外方法,所述方法包括:在细胞培养基中培养干细胞 群体,其中所述细胞培养基含有短效L-抗坏血酸衍生物,但不含有 大量的长效L-抗坏血酸衍生物;和/或补充少于10%v/v胎牛血清。

[0158] 在另一实施方案中,本公开涉及一种用于诱导干细胞中Ang1表 达的体外方法,所述方法包括:在细胞培养基中培养干细胞群体,其 中所述细胞培养基含有短效L-抗坏血酸衍生物,但不含有大量的长 效L-抗坏血酸衍生物;和/或补充非胎儿血清。

[0159] 在另一实施方案中,本公开涉及一种用于诱导干细胞中Ang1表 达的体外方法,所述方法包括:在细胞培养基中培养干细胞群体,其 中所述细胞培养基含有足够支持细胞生长的量的呈成人血清(例如人 类AB血清)形式的非胎儿血清和人类血小板细胞溶解产物。

[0160] 术语“培养基(media)”或“培养基(medium)”在提及细胞培养时使 用时包括细胞周围环境的组分。设想培养基促成和/或提供足够诱导 Ang1表达的表达的条件。培养基可以是固体、液体、气体或各相和 物质的混合物。培养基可以包括液体生长培养基以及不保 持细胞生长 的液体介质。培养基还包括凝胶状培养基,例如琼脂、琼脂糖、明胶 和胶原蛋白基质。示例性气体培养基包括在皮式培养皿(petri dish)或 其它固体或半固体支撑物上生长的细胞所暴露的气相。术语“培养基” 还指意图用于细胞培养中,即使尚未与细胞接 触的物质。

[0161] 用于本公开的方法中的培养基可以通过使用用于培养干细胞的 培养基作为基础 培养基来制备。基础培养基包括例如伊格尔最低必需 (MEM) 培养基、 α 改性MEM培养基和其 混合培养基,且不特别限制, 只要其可以用于培养干细胞即可。

[0162] 此外,本公开的培养基可以含有例如脂肪酸或脂质、维生素、生 长因子、细胞因 子、抗氧化剂、缓冲剂、无机盐等任何组分。

[0163] 用于本公开的细胞培养基含有所有必需氨基酸且还可以含有非 必需氨基酸。一般说来,氨基酸分为必需氨基酸(Thr、Met、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Lys、His) 和非必需氨基 酸(Gly、Ala、Ser、Cys、Gln、Asn、Asp、Tyr、Arg、Pro)。

[0164] 抗坏血酸

[0165] 抗坏血酸是多种细胞在培养时生长和分化的必需补充物。现在了解特定的抗坏血酸衍生物是“短效”的，因为其在溶液中不稳定，尤其是在中性pH值和37°C的正常细胞培养条件下。这些短效衍生物迅速氧化成乙二酸或苏糖酸。在培养基(pH 7)中在37°C下，在24小时内氧化使这些短效抗坏血酸衍生物的水平降低大约80%-90%。因此，在多种细胞类型的常规细胞培养中，短效抗坏血酸衍生物已经替换成更稳定的“长效”抗坏血酸衍生物。

[0166] 在本公开的上下文中，术语“短效”涵盖在中性pH值和37°C的培养条件下24小时细胞培养后氧化大约80%-90%的抗坏血酸衍生物。在一个实例中，短效L-抗坏血酸衍生物是L-抗坏血酸盐。举例来说，在本公开的上下文中，L-抗坏血酸钠盐是“短效”抗坏血酸衍生物。

[0167] 相比之下，术语“长效”涵盖在中性pH值和37°C的培养条件下24小时细胞培养后未氧化大约80%-90%的抗坏血酸衍生物。在一个实例中，在本公开的上下文中，L-抗坏血酸-2-磷酸盐是“长效”抗坏血酸衍生物。长效抗坏血酸衍生物的其它实例包括四己基癸基抗坏血酸酯、抗坏血酸磷酸镁和2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸。

[0168] 本发明人意外地发现长效抗坏血酸衍生物替换成短效衍生物可以诱导干细胞中Ang1表达。因此，在本公开的一个实施方案中，细胞培养基补充短效抗坏血酸衍生物。举例来说，细胞培养基可以含有至少约0.005g/L的短效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有至少约0.01g/L的短效抗坏血酸衍生物。举例来说，细胞培养基可以含有至少约0.02g/L的短效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有至少约0.03g/L的短效抗坏血酸衍生物。举例来说，细胞培养基可以含有至少约0.04g/L的短效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有至少约0.05g/L的短效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有至少约0.06g/L的短效抗坏血酸衍生物。在此实施方案的一个实例中，细胞培养基补充L-抗坏血酸钠盐。

[0169] 在另一实例中，细胞培养基含有短效抗坏血酸衍生物，但不含有大量的长效抗坏血酸衍生物。举例来说，细胞培养基可以含有短效抗坏血酸衍生物，但不超过0.04g/L的长效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有短效抗坏血酸衍生物，但不超过0.03g/L的长效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有短效抗坏血酸衍生物，但不超过0.02g/L的长效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有短效抗坏血酸衍生物，但不超过0.01g/L的长效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有短效抗坏血酸衍生物，但不超过0.005g/L的长效抗坏血酸衍生物。在另一实例中，细胞培养基可以含有短效抗坏血酸衍生物，但不含长效抗坏血酸衍生物。

[0170] 在另一实例中，细胞培养基含有L-抗坏血酸钠盐，但不含有大量的L-抗坏血酸-2-磷酸盐。

[0171] 血清

[0172] 用于本公开的培养方法中的培养基可以是含血清的培养基或无血清的培养基。

[0173] 本公开的培养基可以含有或不含有血清替换品。血清替换品可以是例如白蛋白(例如富含脂质的白蛋白)、转铁蛋白、脂肪酸、胰岛素、胶原蛋白前驱物、微量元素、2'-巯基乙醇或3'-硫醇甘油或适当含有血清同等物的替换品。此类血清替换品可以例如通过国际

公布WO 93/30679中描述的方法制备,且也可以使用市售产品。

[0174] 通常,使用补充至少约10-15% v/v 血清、一般胎牛血清(FCS)的 培养基将干细胞维持在细胞培养中。然而,本发明人已经发现在补充 少于10% v/v FCS的细胞培养基中培养干细胞群体也可以诱导Ang1 表达。在一个实施方案中,干细胞群体在补充至少约9% v/v、至少约 8% v/v、至少约7% v/v、至少约6% v/v、至少约5% v/v、至少约4% v/v、至少约3% v/v、至少约2% v/v、至少约1% v/v FCS的细胞培养 基中培养。还设想在本公开的上下文中术语胎牛血清(fetal calf serum, FCS)和胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)可以互换使用。

[0175] 在一个实施方案中,细胞培养基补充非胎儿血清。设想培养基可 以补充至少约 1% v/v、至少约2% v/v、至少约3% v/v、至少约4% v/v、至少约5% v/v、至少约6% v/v、至少约7% v/v、至少约8% v/v、至 少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至 少约14%、至少约15%、至少约16%、至少约17%、至少约18%、至少约19%、至少约20%、至少约21%、至少约22%、至少约23%、至少约24%、至少约25% v/v 非胎儿血清。

[0176] 举例来说,培养基可以补充哺乳动物非胎儿血清。

[0177] 举例来说,培养基可以补充人类非胎儿血清。

[0178] 举例来说,培养基可以补充新生血清。设想培养基可以补充至少 约1% v/v、至少约2% v/v、至少约3% v/v、至少约4% v/v、至少约 5% v/v、至少约6% v/v、至少约7% v/v、至少约8% v/v、至少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少约14%、至少约15%、至少约16%、至少约17%、至少约18%、至少约19%、至少约20%、至少约21%、至少约22%、至少约23%、至少约24%、至少约25% v/v 新生血清。

[0179] 在一个实施方案中,细胞培养基补充哺乳动物新生血清。

[0180] 举例来说,培养基可以补充新生牛血清(NBCS)。设想培养基可 以补充至少约1% v/v、至少约2% v/v、至少约3% v/v、至少约4% v/v、至少约5% v/v、至少约6% v/v、至少约7% v/v、至少约8% v/v、至 少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至 少约14%、至少约15%、至少约16%、至少约17%、至少约18%、至少约19%、至少约20%、至少约21%、至少约22%、至少约23%、至少约24%、至少约25% v/v NBCS。

[0181] 在一个实施方案中,细胞培养基补充人类新生血清。

[0182] 举例来说,细胞培养基可以补充至少约1% v/v、至少约2% v/v、至少约3% v/v、至少约4% v/v、至少约5% v/v、至少约6% v/v、至 少约7% v/v、至少约8% v/v、至少约9% v/v 人类新生血清。举例来 说,人类新生血清从脐带血“脐带血”获得。

[0183] 在一个实施方案中,培养基补充成年血清。设想培养基可以补充 至少约1% v/v、至少约2% v/v、至少约3% v/v、至少约4% v/v、至 少约5% v/v、至少约6% v/v、至少约7% v/v、至少约8% v/v、至少 约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少 约14%、至少约15%、至少约16%、至少约17%、至少约18%、至 少约19%、至少约20%、至少 约21%、至少约22%、至少约23%、至少约24%、至少约25% v/v 成年血清。

[0184] 在一个实施方案中,细胞培养基补充哺乳动物成年血清。

[0185] 举例来说,细胞培养基可以补充至少约1% v/v、至少约2% v/v、至少约3% v/v、至少约4% v/v、至少约5% v/v、至少约6% v/v、至 少约7% v/v、至少约8% v/v、至少约9%、至 少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少约14%、至少约15%、至少约16%、

至少约17%、至少约18%、至少约19%、至少约20%、至少约21%、至少约22%、至少约23%、至少约24%、至少约25%v/v哺乳动物成年血清。

[0186] 举例来说,细胞培养基可以补充至少约1%v/v、至少约2%v/v、至少约3%v/v、至少约4%v/v、至少约5%v/v、至少约6%v/v、至少约7%v/v、至少约8%v/v、至少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少约14%、至少约15%、至少约16%、至少约17%、至少约18%、至少约19%、至少约20%、至少约21%、至少约22%、至少约23%、至少约24%、至少约25%v/v成年牛血清。

[0187] 在一个实施方案中,细胞培养基补充成人血清。

[0188] 举例来说,细胞培养基可以补充至少约1%v/v、至少约2%v/v、至少约3%v/v、至少约4%v/v、至少约5%v/v、至少约6%v/v、至少约7%v/v、至少约8%v/v、至少约9%v/v成人血清。

[0189] 举例来说,细胞培养基可以补充至少约1%v/v、至少约2%v/v、至少约3%v/v、至少约4%v/v、至少约5%v/v、至少约6%v/v、至少约7%v/v、至少约8%v/v、至少约9%v/v人类AB血清。

[0190] 在一个实例中,细胞培养基补充至少约3%人类AB血清。

[0191] 在一个实施方案中,培养基补充FCS与NBCS的混合物。

[0192] 举例来说,培养基可以补充FCS与NBCS的混合物,使得 FCS:NBCS 比率为至少约0.4:1、至少约0.5:1、至少约0.6:1、至少约0.7:1、至少约0.8:1、至少约0.9:1、至少约1:1、至少约1.5:1、至少约2:1。

[0193] 举例来说,设想FCS与NBCS的混合物可以占细胞培养基的至少约1%v/v、至少约2%v/v、至少约3%v/v、至少约4%v/v、至少约5%v/v、至少约6%v/v、至少约7%v/v、至少约8%v/v、至少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少约14%、至少约15%、至少约16%、至少约17%、至少约18%、至少约19%、至少约20%、至少约21%、至少约22%、至少约23%、至少约24%、至少约25%v/v。然而,在此实例中,细胞培养基补充至少约1%v/v、至少约2%v/v、至少约3%v/v、至少约4%v/v、至少约5%v/v、至少约6%v/v、至少约7%v/v、至少约8%v/v、至少约9%v/v,但少于10%v/v FCS。

[0194] 在一个实施方案中,细胞培养基无FCS血清。

[0195] 在一个实施方案中,细胞培养基无胎儿血清。

[0196] 在一个实施方案中,细胞培养基补充非胎儿血清。

[0197] 在一个实施方案中,培养基无胎儿血清且补充非胎儿血清。

刺激因子

[0199] 在另一个实施方案中,细胞培养基补充一种或多种选自由以下组 成的组的刺激因子:1 α ,25-二羟基维生素D3(1,25D)、血小板衍生生长因子(PDGF)(例如PDGF-BB)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、基质衍生因子1 α (SDF-1 α)和EGF。

[0200] 在另一个实施方案中,细胞也可以在足够支持细胞生长的量的至少一种细胞因子存在下培养。

[0201] 在另一个实施方案中,细胞在足够支持细胞生长的量的血小板细胞溶解产物存在下培养。举例来说,细胞可以在足够支持细胞生长的量的人类血小板细胞溶解产物中培养。

[0202] 在一个实例中,细胞用足够支持细胞生长的量的人类AB血清和 人类血小板细胞溶解产物培养。

[0203] 分析细胞的治疗/预防潜能

[0204] 本领域技术人员将显而易见用于测定本公开的细胞治疗或预防 或延迟病症发作或进展的能力的方法。举例来说,可以评估本发明的 干细胞增加Ang1水平的能力。

[0205] 在一个实例中,测试表达至少 $0.1\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的量的Ang1的 未遗传修饰的干细胞在体外和/或体内在心脏组织中增加Ang1水平 的能力。在这些实例中,在施用本发明的干细胞后在细胞培养基或组 织中评估Ang1水平。

[0206] 熟练技工从上述将显而易见,本公开还提供了一种鉴别或分离细 胞用于治疗、预 防或延迟病症的方法,所述方法包括:

[0207] (i)向罹患相关病症的受试者施用细胞并评估受试者的病症的症 状;

[0208] (ii) 将 (i) 中受试者病症的症状与罹患病症的尚未施用细胞的对 照受试者的病 症症状或活性比较,其中与对照受试者比较,测试受试 者中症状的改善表明干细胞治疗所 述病症。细胞可以是本文根据任何 实例所述的任何细胞。

[0209] 本领域技术人员应了解在不脱离本公开的广泛的总范围下可以 对上述实施方案进 行许多变化和/或修改。因此,本发明的实施方案 在各个方面都被认为是例示性而非限 制性的。

实施例

[0210] 实施例1:通过选择STRO-3⁺细胞进行MPC免疫选择

[0211] 骨髓(BM)是从健康的正常成年志愿者(20-35岁)收获。简单地说, 从髂后嵴吸出 40ml BM到含有肝素锂抗凝剂的管中。

[0212] 如先前描述(Zannettino等人1998),通过使用LymphoprepTM (Nycomed Pharma, Oslo,Norway) 进行密度梯度分离来制备BMMNC。在 $400\times g$ 下在4°C下离心30分钟后,用移液管去除血沉棕黄层,并 在由含有5%胎牛血清(FCS, CSL Limited, Victoria, Australia) 的汉克氏 平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD) 构成的“HFF”中洗涤三次。

[0213] 随后通过如先前描述的磁性活化细胞分类(Gronthos等人2003; Gronthos和 Simmons 1995) 来分离STRO-3⁺(或TNAP⁺) 细胞。简单地 说,大约 $1-3\times 10^8$ BMMNC在由含10% (v/v) 正常兔血清的HFF组成 的阻断缓冲液中在冰上培育20分钟。将细胞与 $200\mu\text{l}$ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ STRO-3mAb于阻断缓冲液中的溶液一起在冰上培育1小时。随后细 胞在HFF中通过在 $400\times g$ 下离心洗涤两次。添加HFF缓冲液中山羊 抗小鼠 γ -生物素(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, UK) 的1/50稀释液并将细胞在冰上培育1小时。将细胞在MACS缓 冲液 (补充1%BSA、5mM EDTA和0.01%叠氮化钠的无Ca²⁺和Mn²⁺的PBS) 中如上洗涤两次并 再悬浮于0.9ml最终体积的MACS缓冲液中。

[0214] 将 $100\mu\text{l}$ 抗生蛋白链菌素微珠(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) 添加到细胞悬浮液中并在冰上培育15分钟。将细胞悬浮液 洗涤两次并再悬浮于0.5ml MACS缓冲液中,且随后负载到微型 MACS柱(MS Columns,Miltenyi Biotec)上,且用0.5ml MACS缓冲液 洗涤三次,以收回不结合STRO-3mAb(以寄存编号PTA-7282于2005 年12月19日

寄存在美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC) - 参见国际公布WO 2006/108229)的细胞。添加另 外1ml MACS缓冲液后,将柱从磁体去除并通过正压分离TNAP⁺细 胞。来自各洗脱份的细胞的等分试样可以用抗生蛋白链菌素-FITC染 色,并通过流动式细胞测量术评估纯度。

[0215] 以此方式分离的MPC是STRO-1^高MPC。

[0216] 实施例2:起始培养基-过程A

[0217] 具有厄尔平衡盐(Earle's balanced salt)的伊格尔氏最低必需培养 基(MEM)的 α 改性通常称为伊格尔氏 α MEM,其含有非必需氨基酸、丙酮酸钠和其它维生素。这些改性首次描述用于生长杂交小鼠和仓鼠 细胞(Stanners等人1971)。

[0218] 适于培养初级干细胞的伊格尔氏 α MEM培养基可以从多种来源 获得,包括Life Technologies和Sigma。

[0219] 建立初级干细胞培养物的详细方法,包括用于例示过程中的所需 生长因子,描述于Gronthos和Simmons 1995中。

[0220] 在过程A中,补充10%胎牛血清、L-抗坏血酸-2-磷酸盐(100 μ M)、地塞米松(10-7M)和/或无机磷酸盐(3mM)的伊格尔氏 α MEM培养基 用于培养干细胞。

[0221] 实施例3:改性培养基-过程B

[0222] 在过程B中,通过以下,来改性用于过程A的伊格尔氏 α MEM 培养基(改性 α MEM) :

[0223] -将长效抗坏血酸衍生物L-抗坏血酸-2-磷酸盐替换成短效抗坏 血酸衍生物L-抗坏血酸钠(50mg/L) ;

[0224] -FCS从10% v/v减少到5% v/v;

[0225] -补充非胎儿血清(5% v/v)。

[0226] 表1:过程A与B之间的差异概述

	过程 A	过程 B
培养基(可应用到解冻、馈入、传代的改变)		
	α MEM 10% v/v FCS	改性培养基 50 mg/L L-抗坏血酸钠替换 L-抗坏血酸-2-磷酸盐 5% v/v FCS 5% v/v 非胎儿血清
[0227]		
低温保存调配物(50% α-MEM/42.5% ProFreeze/7.5% DMSO)		
	α MEM 10% v/v FCS	改性 α MEM 50 mg/LL-抗坏血酸钠替换 L-抗坏血酸-2-磷酸盐 5% v/v FCS 5% v/v 非胎儿血清

[0228] 实施例4:细胞培养

[0229] 间质前驱细胞(MPC) 是从单个供体获得并在低温保存后存储。

[0230] 一般地说,细胞培养涉及以下步骤:

[0231] 将低温保存的MPC解冻,以10,000个细胞/平方厘米接种,并在 起始培养基(过程A;n=3)或者改性培养基(过程B;n=3) 中在20% O₂、37℃下生长到90%汇合。

[0232] 为了产生条件培养基,将生长培养基替换成补充FCS的EBM-2 基础培养基(Lonza),体积是200 μ l培养基/平方厘米。将细胞再培养 3天,接着收集培养基并离心,以去除任何细胞,并将所得上清液收集且存储在-80°C下。

[0233] 使用Luminex平台,使用市售试剂盒(Millipore) 测量生长因子浓度。

[0234] 细胞培养后,评估MPC生长动力学(参见图1-3)。在细胞培养过程A和B后,未观测到细胞生长、MPC倍增时间或群体倍增时间显著变化。

[0235] MPC还根据其细胞标记物STRO-1、CC9和STRO-4以及促血管生成生长因子Ang1和VEGF的表达水平进行表征。

[0236] 在细胞培养过程A和B后,MPC中STRO-1、CC9和STRO-4 水平是可比的。

[0237] 然而,培养过程B:

[0238] -增加Ang1水平;

[0239] -减少VEGF水平;

[0240] -Ang1:VEGF比率与以前证明特别有效地加强血管形成的 Ang1:VEGF比率一致。

[0241] 在过程A或B中培养的MPC的条件培养基中Ang1和VEGF的 水平(μ g/ 10^6 个细胞) 的测量展示于表2中。

[0242] 表2:从单个供体(三个复制品) 中获得的MPC在过程A和B后 的表征

培 养 过 程	复 制 品	Ang 1 水 平 μ g/ 10^6 个 细 胞	平均值	VEGF 水 平 μ g/ 10^6 个细胞	平均值	Ang1 水 平 / VEGF 水 平 比 率	平均值
[0243]	A	1	0.048	0.045	0.134	0.358 : 1	0.328 : 1
	A	2	0.059	0.172		0.343 : 1	
	A	3	0.029	0.102		0.284 : 1	
	B	1	0.733	0.72	0.027	27.1 : 1	29.6 : 1
	B	2	0.717	0.020		35.9 : 1	
	B	3	0.723	0.028		25.8 : 1	

[0244] 实施例5:改性培养条件-过程C和D

[0245] 为了控制长效抗坏血酸衍生物L-抗坏血酸-2-磷酸盐替换成短效 抗坏血酸衍生物L-抗坏血酸钠,来自3个不同供体的MPC连续在 α -MEM+10%FCS+50mg/L L-抗坏血酸钠(过程C) 或 α -MEM+3% 人类AB血清+50mg/L L-抗坏血酸钠(过程D) +生长因子(例如 PDGF和EGF) 中增殖。

[0246] 在过程C和D中细胞培养后评估Ang1和VEGF水平。在过程C 或D中培养的MPC的条件培养基中Ang1和VEGF的水平(μ g/ml) 展示于表3中。

[0247] 与过程C比较,培养过程D:

[0248] -增加Ang1水平;

[0249] -减少VEGF水平;

[0250] -增加Ang1:VEGF比率。

[0251] 与过程A比较,过程C和D使Ang1的表达水平逐渐增加。此 表明短效抗坏血酸衍生物和非胎儿血清的存在各独立地增加Ang1表达且对增加Ang1表达一起展现协同效应。

[0252] 表3:来自3个不同供体(三个复制品) 的MPC在过程C和D后 的表征

培养过程	供体样品	Ang1 水平 μg/10 ⁶ 个细胞	平均值	VEGF 水平 μg/10 ⁶ 个细胞	平均值	Ang1 水平/VEGF 水平比率	平均值
[0253]	C 1	0.143	0.136	0.430	0.328	0.333:1	0.409 : 1
	C 2	0.164		0.266		0.523:1	
	C 3	0.102		0.287		0.370:1	
	D 1	0.266	0.191	0.164	0.109	1.73:1	2.11 : 1
	D 2	0.164		0.061		3.20:1	
	D 3	0.143		0.102		1.40:1	

[0254] 本发明的人胚胎干细胞不是通过利用经过体内发育的受精超过 14天的人类胚胎分离或者获取的。

[0255] 本领域技术人员应了解,在不脱离如广泛描述的本公开的精神或 范围下,可对如特定实施方案中所示的公开内容进行许多改变和/或 修改。因此,本发明的实施方案在各个方面都被认为是例示性而非限 制性的。

[0256] 本申请主张于2014年4月7日提出的AU 2014901247的优先权, 其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0257] 本文中论述和/或提及的所有公布都整体并入本文中。

[0258] 已经包括在本说明书内的文献、法案、材料、装置、论文等的任 何论述都仅仅是为了提供本公开的背景。并不因为任何或所有这些内 容在本申请的每个权利要求的优先权日前已存在而承认其形成现有 技术基础的一部分,或是与本公开有关的领域中的公知常识。

[0259] 参考文献

[0260] 1.Bongso et al.1889,Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells.Human Reprod.,4(6),706-13.

[0261] 2.Chae et al.2000,Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization.Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.20,2573- 2578.

[0262] 3.Eisenberg&Bader,1996,Establishment of the mesodermal cell line QCE-6.A model system for cardiac cell differentiation.Circ Res.,78(2),205-16.

[0263] 4.Gnecchi et al.2008,Paracrine mechanisms in adult stem cell signalling and therapy. Circ Res.,103(11),1204-1219.

[0264] 5.Huang et al.2011,Transplantation of Sendai Viral Angiopoietin-1-Modified Mesenchymal Stem Cells for Ischemic Heart Disease.Targets in Gene Therapy,Prof. Yongping You(Ed.),ISBN:978-953-307-540-2,InTech,DOI:10.5772/19590.

[0265] Available from:<http://www.intechopen.com/books/targets-in-gene-therapy/transplantation-of-sendai-viral-angiopoietin-1-modified-mesenchymal-stem-cells-for-ischemic-heart-di>.

- [0266] 6.Gronthos and Simmons 1995,The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow derived stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro.Blood,85,929-940.
- [0267] 7.Gronthos et al.(2003)Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow.Journal of Cell Science 116: 1827-1835
- [0268] 8.Kanatsu-Shinohara et al.2003,Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells,Biol.Reprod.,69 (2) , 612-616.
- [0269] 9.Kim et al.2001a,Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1,VCAM-1, and E-selectin expression.Circ Res., 89 (6) ,477-479.
- [0270] 10.Kim et al.2001b,Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells.FASEB J.,16(1),126-128.
- [0271] 11.Lijie et al.2007,Mesenchymal stem cells modified with angiopoietin-1 improve remodelling in a rat model of acute myocardial infarction.Biochem Biophys Res Commun.,357 (3) ,779-84.
- [0272] 12.Matsui et al.1992,Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture.Cell,70 (5) :841-7.
- [0273] 13.Mummery et al.2002,Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells.J Anat.,200 (3) ,233-242.
- [0274] 14.Passier Ret al.2005,Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures.Stem Cells,23 (6) ,pg 772-80.
- [0275] 15.Resnick et al.1992,Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture.Nature,359 (6395) ,550-551.
- [0276] 16.Reubinoff et al.2000,Embryonic stem cell lines from human blastocysts:somatic differentiation in vitro.Nat Biotechnol.,18 (4) ,399-404.
- [0277] 17.Shamblott et al.1998,Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95 (23) ,13726-31.
- [0278] 18.Shinohara et al.2004,Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis,Cell,119 (7) ,1001-1012.
- [0279] 19.Stanners et al.,1971,Two Types of Ribosome in Mouse-Hamster Hybrid Cells.Nat New Biol.,230,52-54.
- [0280] 20.Takebayashi et al.2008,Experimental Medicine,26 (5) (Suppl.) ,41-46, YODOSHA (Tokyo, Japan) .
- [0281] 21.Thomson et al.1995,Isolation of a primate embryonic stem cell line,Proc.Natl. Acad.Sci USA,92 (17) ,7844-8.
- [0282] 22.Thomson et al.1996,Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts.Biol.Reprod.,55 (254) ,254-9.

- [0283] 23.Thomson et al.1998,Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science,282,1145-7.
- [0284] 24.Vacanti,et al.1991,Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation.Plast.Reconstr.Surg.88,753-9.
- [0285] 25.Yoshiaki et al.2012,Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells.Histochemistry&Cell Biology,137 (6) ,719 -732.
- [0286] 26.Zannettino,A.C.et al.1998,The Sialomucin CD164 (MGC-24v) Is an Adhesive Glycoprotein Expressed by Human Hematopoietic Progenitors and Bone Marrow Stromal Cells That Serves as a Potent Negative Regulator of Hematopoiesis.Blood 92: 2613-2628.

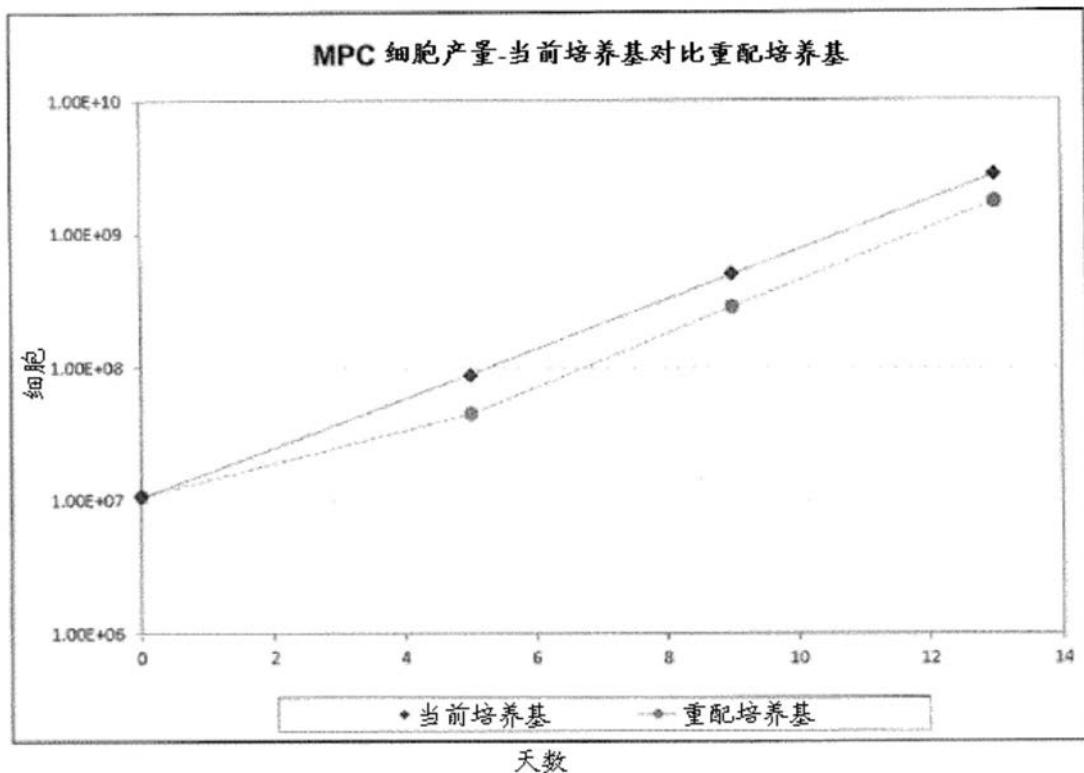


图1

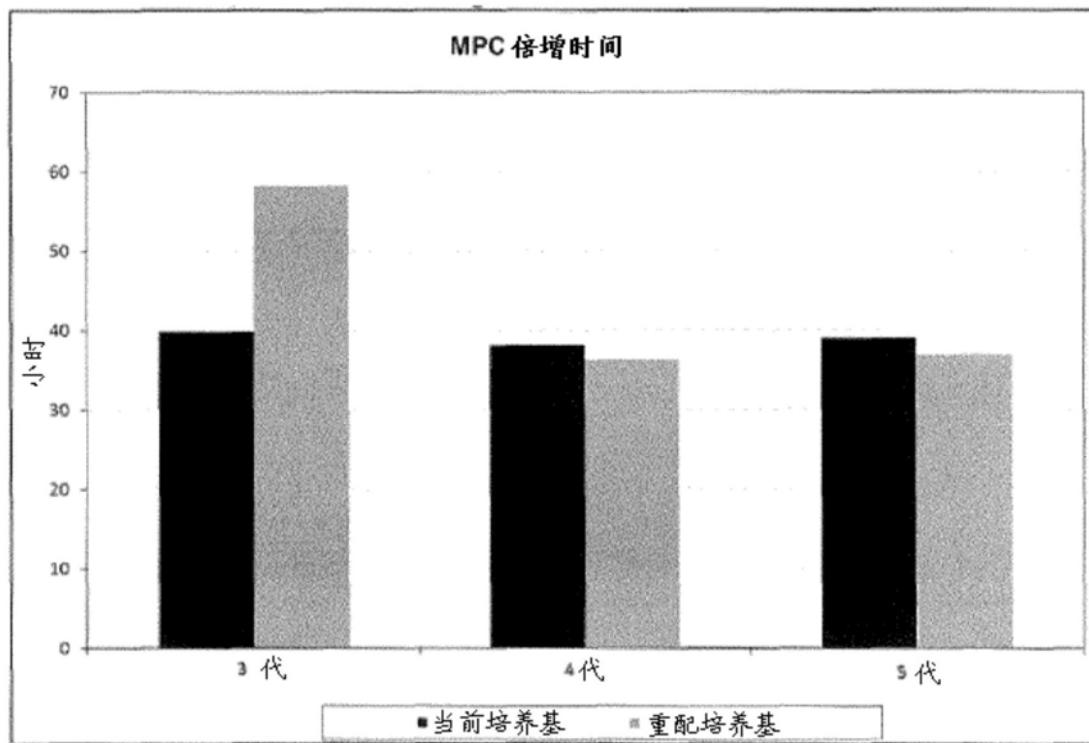


图2

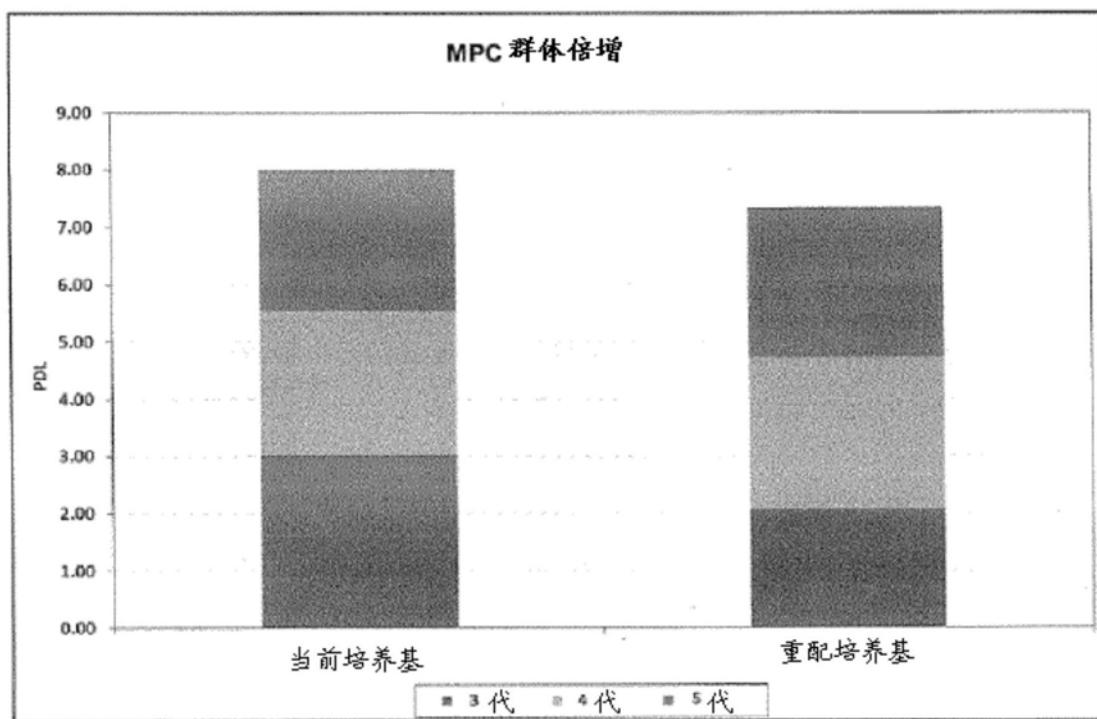


图3