



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107028981 B

(45) 授权公告日 2021. 04. 20

(21) 申请号 201611144948.X

(22) 申请日 2008.09.02

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107028981 A

(43) 申请公布日 2017.08.11

(30) 优先权数据  
60/960,184 2007.09.19 US

(62) 分案原申请数据  
200880116645.4 2008.09.02

(73) 专利权人 普拉里斯坦有限公司  
地址 以色列海法

(72) 发明人 M·梅伦 A·托伦 R·奥菲尔  
Z·阿伯曼 N·德罗里-卡米

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002

代理人 王健

(51) Int.Cl.

C12N 5/07 (2010.01)

A61K 35/50 (2015.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2007108003 A2,2007.09.27

US 2005265980 A1,2005.12.01

CN 1746295 A,2006.03.15

CN 1746296 A,2006.03.15

CN 1548529 A,2004.11.24

CN 1281739 C,2006.10.25

Mauro Krampera等.Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair.《BONE》.2006,第39卷(第4期),第678-673页.

审查员 钟辉

权利要求书1页 说明书58页 附图36页

(54) 发明名称

来自脂肪或胎盘组织的粘附细胞及其在治疗中的用途

(57) 摘要

公开了治疗需要其的受试者中缺血的方法。该方法包括给予受试者治疗有效量的选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞,藉此治疗受试者的缺血。也公开了治疗需要结缔组织再生和/或修复的医学状况的方法。

1. 培养的粘附基质细胞在制备治疗需要结缔组织再生的状况或需要结缔组织修复的状况的药物中的用途, 其中所述需要结缔组织再生的状况或需要结缔组织修复的状况选自腱受损以及韧带受损, 其中所述基质细胞来源于胎盘, 并使其粘附到粘附材料上, 藉此分离粘附细胞, 并随后转移至三维 (3D) 载体并在三维 (3D) 培养中增殖, 然后随后从所述载体分离。

2. 权利要求1的用途, 其中所述培养的粘附基质细胞能够抑制受试者中的免疫反应。

3. 权利要求1的用途, 其中所述三维培养包括三维生物反应器。

4. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述培养的粘附基质细胞在所述三维培养中的培养在灌注下实现。

5. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述三维载体包括聚酯的粘附材料。

6. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述培养的粘附基质细胞表达选自CD73、CD90、CD29和CD105的标记。

7. 权利要求1-3中任一项的用途, 其中所述培养的粘附基质细胞不表达选自CD45、CD80、HLA-DR、CD11b、CD14、CD19、CD34和CD79的标记。

8. 权利要求1用途, 其中所述培养的粘附基质细胞包含基质干细胞表型。

9. 权利要求1的用途, 其中所述需要结缔组织修复的状况是腱受损。

10. 权利要求1的用途, 其中所述需要结缔组织修复的状况是韧带受损。

## 来自脂肪或胎盘组织的粘附细胞及其在治疗中的用途

[0001] 本申请是2008年9月2日提交的题为“来自脂肪或胎盘组织的粘附细胞及其在治疗中的用途”的中国专利申请200880116645.4的分案申请。

[0002] 发明领域和背景

[0003] 本发明涉及使用来自脂肪或胎盘组织的粘附细胞治疗疾病的方法,更具体而言,涉及使用粘附细胞治疗缺血和/或需要结缔组织再生和/或修复的医学状况。

[0004] 在日益发展的医学界,越来越需要大量的成体干细胞用于细胞移植植入和组织工程。此外,成体干细胞疗法正持续发展用以治疗和治愈各种状况,例如造血障碍、心脏病、帕金森病、阿耳茨海默病、中风、烧伤、肌肉萎缩症、自身免疫性疾病、糖尿病和关节炎。

[0005] 近些年来,大量的研究活动集中在间充质基质细胞(MSCs)用于包括受损器官例如大脑、心脏、骨骼和肝的组织修复以及支持骨髓移植(BMT)在内的各种医学应用的治疗潜能。MSCs是获自例如骨髓、脂肪组织、胎盘和血液的异源细胞群,可依靠来自各种生物活性因子的影响分化成不同类型的间充质成熟细胞(例如,网状内皮细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、成骨前体细胞)。因此,MSCs已在再生医学中被广泛研究作为构造新组织例如骨、软骨和脂肪的基础用于损伤修复或病变组织的置换以及用于治疗遗传和获得性疾病[Fibbe和Noort,Ann N Y Acad Sci (2003) 996:235-44;Horwitz等,Cytotherapy (2005) 7 (5):393-5;Zimmer和Hare,Basic Res Cardiol (2005) 100 (6):471-81]。而且,MSCs的多能性、它们的易于分离和培养以及它们的先体外后体内(ex vivo)高增殖潜能使它们成为有吸引力的治疗工具[Fibbe和Noort,上文;Minguell等Exp Biol Med (Maywood) (2001) 226 (6):507-20]。

[0006] 源自胎盘的MSCs显示出许多与分离自其它组织的MSCs共有的标记,例如CD105、CD73、CD90和CD29,以及缺少造血细胞、内皮细胞和滋养层-特异细胞标记的表达。已在适当条件下培养源自胎盘的MSCs之后完成成脂性、成骨性和神经原性分化[Yen等,Stem Cells (2005) 23 (1):3-9]。而且,分离自胎盘并体外培养的MSCs已被证明以与MSCs相似的方式免疫豁免。因此,胎盘为实验和临床应用提供伦理上无争议的并且易于获得的MSCs来源[Zhang等,Exp Hematol (2004) 32 (7):657-64]。

[0007] 本发明人之前已设计了适于源自胎盘的MSCs扩增的三维(3D)培养条件(PCT申请第IL2007/000380号),其完整内容通过引用并入本文。

[0008] MSCs的主要临床用途总结于下文。

[0009] 缺血

[0010] 外周动脉病(PAD)

[0011] 外周动脉病(PAD)为一种慢性疾病,其可进行性限制肢体的血流从而可导致严重的医学并发症。这一疾病通常与其他临床状况相关,包括高血压、心血管病、高血脂症、糖尿病、肥胖症和中风。严重肢体缺血(CLI)用于描述患有慢性缺血诱导的疼痛、溃疡、组织缺损或肢体坏疽的患者。CLI代表PAD患者的末期,它们需要通过血管外科或血管专家的综合治疗。与冠状动脉和大脑动脉病相反,外周动脉病(PAD)仍然是未被完全了解的状况,尽管病情严重且非常流行但很少被诊断出并且甚至更少被治疗。结果,CLI经常导致截肢或死亡且PAD患者的死亡率超过心肌梗塞和中风患者的死亡率。

[0012] 为了治疗缺血状况已使用了多种成体干细胞。因此,源自脂肪组织的基质细胞(ADSC)和内皮细胞(EC)的共培养主要通过VEGE和HGF的分泌引起EC存活率、迁移和管腔形成的显著增加。将基质细胞移植到缺血小鼠后肢四周后血管生成评分得到改善[Nakagami等,J Atheroscler Thromb (2006) 13 (2) :77-81]。Moon等[Cell Physiol Biochem. (2006) 17:279-90]已检测源自脂肪组织的祖细胞(ADSC)治疗免疫缺陷小鼠肢体缺血的能力并证明了ADSC-移植组中激光多普勒灌注指数的显著增加。

[0013] 此外,当源自脐带血(UCB)的间充质干细胞被移植到四名已接受药物治疗和手术治疗的伯格氏病患者中时,他们患肢的缺血性静息痛突然消失[Kim等,Stem Cells (2006) 24 (6) :1620-6]。而且,将分离自足月胎盘胎膜的人间充质干细胞(FMhMSC)移植入梗塞的大鼠心脏与毛细血管密度增加、左心室功能正常化以及瘢痕组织的显著减少相关,这些情况在将干细胞与透明质烷与丁酸和视黄酸形成的混合酯预处理时被增强[Ventura等, (2007) J. Biol. Chem., 282:14243-52]。

[0014] 中风

[0015] 中风是全世界死亡的主要诱因之一,引起约9%的所有死亡并消耗约2-4%的总医疗费用。尽管很可能因为提高了对中风危险因素(尤其是高血压、糖尿病和吸烟)的控制,发达国家的中风死亡率已持续降低,但是中风仍然可导致永久性损伤(例如,组织损伤、神经损伤)。

[0016] 新的中风治疗方案包括干细胞疗法。已设想将干细胞或祖细胞局部或通过静脉内途径移植入受损位点以替代无功能细胞、增强内源干细胞或祖细胞的增殖和/或分化且提供必要的免疫调节子,并作为主要的以细胞为基础的策略。干细胞/祖细胞的潜在来源包括胎儿神经干细胞、胚胎干细胞、神经畸胎瘤细胞、源自脐带血的造血干细胞、源自骨髓的干细胞以及源自胎盘的间充质干细胞[Andres等,Neurosurg Focus (2008) 24 (3-4) :E16]。

[0017] 在一项最近的研究中,Koh等[Koh等,Brain Res. (2008)]检测了移植的源自人脐带血的间充质干细胞(hUC-MSCs)在缺血中风大鼠模型中的神经保护作用 and 机制。体外诱导神经元分化二十天后,hUC-MSCs显示出神经元的形态学特征并表达神经元细胞标记和神经元因子(例如,源自神经胶质细胞系的神经营养因子、源自脑的神经营养因子)。而且,将hUC-MSCs体内移植到免疫抑制的缺血中风大鼠的受损脑半球可相对于对照大鼠改善神经行为功能且减少梗塞体积。移植后三周,hUC-MSCs出现在受损半球中并表达神经元-特异标记,但这些细胞没有成为功能活性神经元细胞。

[0018] 矫形外科应用

[0019] 多种状况和病理需要结缔组织(例如,骨、腱和韧带)的再生和/或修复。这些包括,例如,骨折、烧伤、烧伤创面、深度创伤、退化骨、各种癌症相关的结缔组织损失(例如,骨癌、骨肉瘤、骨转移)以及关节软骨缺损。

[0020] 使用自体BM-MSCs增强骨愈合已被描述用于兽医和人的矫形外科应用且包括经皮注射骨髓用于韧带愈合(Carstanjen等,2006)、矫形临床中通过骨髓的自体移植或同种异体移植治疗骨缺损(Horwitz等,1999,Horwitz等,2002)、使用负载于由羟基磷灰石-磷酸三钙组成的陶瓷圆柱体上的同种异体的[Arinzech TL,等,J Bone Joint Surg Am.2003, 85-A (10) :1927-35]或自体的[Bruder SP等,J Bone Joint Surg Am.1998 Jul;80 (7) : 985-96]骨髓-MSCs在狗中,或使用同种异体的源自外周血的MSCs(Chao等,2006.)在兔子中

进行临界大小骨缺损的再生,以及使用MSCs移植在狒狒中进行大量的骨形成(Livingston等,2003)。

[0021] 在马矫形外科领域中,BM和脂肪组织来源的间充质干细胞已实验性用于手术治疗软骨下骨囊肿、骨折修复[Kraus和Kirker-Head,Vet Surg (2006) 35 (3):232-42]和软骨修复[Brehm等,Osteoarthritis Cartilage (2006) 14 (12):1214-26;Wilke等,J Orthop Res (2007) 25 (7):913-25]以及临床用于治疗马过度劳累引起的腱损伤。而且,已使用不同的治疗方法促进马的悬韧带愈合(Herthel,2001)。Herthel (2001) 已证明了一种辅助悬韧带愈合的新生物学方法,其涉及损伤内注射自体干细胞和相关的骨髓组分以刺激天然韧带再生。

[0022] 腱受损的兔子模型显示经MSC-处理的组织比天然修复的组织更强壮和坚硬(Gordon等,2005)。此外,将培养的MSCs接种到腱裂隙处引起显著改善的修复生物力学(Young等,1998,Osiris Therapeutics,www.osiris.com)。

[0023] 现正在患者体内检测Osiris软骨素原(成体间充质干细胞)以评价其安全性和有效性。在经MSC处理的动物中,手术移除的半月板组织再生,软骨表面得到保护且与对照动物相比观察到关节损伤减少。这些益处动物模型中持续至少一年(Osiris Therapeutics,www.osiris.com)。

#### [0024] 发明概述

[0025] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了治疗需要其的受试者中缺血的方法,该方法包括给予受试者治疗有效量的选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞,藉此治疗受试者的缺血。

[0026] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了治疗需要其的受试者中的需要结缔组织再生和/或修复的医学状况的方法,该方法包括给予受试者治疗有效量的选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞,藉此治疗受试者中需要结缔组织再生和/或修复的医学状况。

[0027] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞在制备经鉴定用于治疗缺血的药剂中的用途。

[0028] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞在制备经鉴定用于治疗需要结缔组织再生和/或修复的医学状况的药剂中的用途。

[0029] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了一种制备物品,其包括包含用于治疗缺血的标签的包装材料,该包装材料包装药用有效量的选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞。

[0030] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了一种制备物品,其包括包含用于治疗需要结缔组织再生和/或修复的医学状况的标签的包装材料,该包装材料包装药用有效量的选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞。

[0031] 根据本发明的一些实施方案,该粘附细胞可抑制受试者中的免疫反应。

[0032] 根据本发明的一些实施方案,至少10%的粘附细胞处于增殖期。

[0033] 根据本发明的一些实施方案,该缺血为外周动脉病(PAD)。

[0034] 根据本发明的一些实施方案,该外周动脉病(PAD)为严重肢体缺血(CLI)。

[0035] 根据本发明的一些实施方案,该缺血包括中枢神经系统(CNS)的缺血。

[0036] 根据本发明的一些实施方案,该缺血选自外周动脉病、缺血性血管病、缺血性心脏

病、缺血性脑病、缺血性肾病以及缺血胎盘。

[0037] 根据本发明的一些实施方案,该粘附细胞获自三维 (3D) 培养。

[0038] 根据本发明的一些实施方案,该三维 (3D) 培养包括3D生物反应器。

[0039] 根据本发明的一些实施方案,在3D培养中的细胞培养在灌注下实现。

[0040] 根据本发明的一些实施方案,三维培养的培养条件包括选自聚酯和聚丙烯的粘附材料。

[0041] 根据本发明的一些实施方案,细胞培养至少进行3天。

[0042] 根据本发明的一些实施方案,细胞培养进行至至少10%的细胞正在增殖。

[0043] 根据本发明的一些实施方案,该粘附细胞包含选自CD73、CD90、CD29和CD105的阳性标记表达。

[0044] 根据本发明的一些实施方案,该粘附细胞包含选自CD3、CD4、CD45、CD80、HLA-DR、CD11b、CD14、CD19、CD34和CD79的阴性标记表达。

[0045] 根据本发明的一些实施方案,该粘附细胞包含基本上如本文所述的表达概况。

[0046] 根据本发明的一些实施方案,该粘附细胞包括包含基质干细胞表型的细胞。

[0047] 根据本发明的一些实施方案,该基质干细胞表型包括T细胞抑制活性。

[0048] 根据本发明的一些实施方案,该结缔组织包括腱、骨和/或韧带。

[0049] 根据本发明的一些实施方案,需要结缔组织再生和/或修复的医学状况选自骨折、骨癌、烧伤创面、关节软骨缺损和深层创伤。

[0050] 根据本发明的一些实施方案,该医学状况选自软骨下骨囊肿、骨折、骨质疏松症、骨关节炎、退化骨、骨癌、软骨损伤、关节软骨缺损、视乳头变性疾病、成骨不全 (OI)、烧伤、烧伤创面、深层创伤、创伤愈合延迟、腱受损以及韧带受损。

[0051] 除非另外指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述那些相似或等同的方法和材料可用于实施或检验本发明,但是下文仍描述了合适的方法和材料。如有矛盾之处,以专利说明书包括定义为准。此外,材料、方法和实施例仅用于说明且不具有限制性。

[0052] 附图简述

[0053] 参考附图仅以举例方式在本文中描述本发明。现具体参考附图的详细内容,强调的是,通过举例方式显示具体内容且仅用于说明性讨论本发明的实施方案,并且是为了提供什么被认为是本发明原理和构思方面的最有用和最易理解的说明而提出。在这一点上,不试图显示比基本理解本发明所需的更详细的本发明结构性细节,对附图所作的说明使得本领域技术人员明白本发明的数种形式如何在实践中具体化。

[0054] 附图中:

[0055] 图1A-G描述在包含3D载体的生物反应器系统中产生的类骨微环境。图1A-B为描述天然骨 (图1A) 和接种粘附细胞,模拟骨微环境后7天PluriX™ 3D载体结构 (图1B) 的比较大的电子显微照片。图1C-F为描述用骨髓产生的粘附细胞接种的PluriX™ 3D基质在接种后20天 (图1C-D,分别放大X 150和250) 和40天 (图1E-F,分别放大X 350和500) 的电子显微照片。图1G为具有由编号定义的单独部件的Plurix 3D活塞流动生物反应器的图:培养基库 (1)、混合气体供给 (2)、过滤器 (3)、注射点 (4)、在其中放置3D载体的柱 (5)、流量监控器 (6)、流量阀 (6a)、分离容器 (7)、细胞生长分析仪 (8)、蠕动泵 (9)、取样点 (10)、溶O<sub>2</sub>测量电极 (11)、pH

测量电极 (12)、控制系统 (13)、新鲜生长培养基 (14)、用过的生长培养基 (15)。

[0056] 图2是描述在生物反应器系统内3D生长条件下生长的来源于胎盘的粘附细胞不同生产批次的图(批次5-8)。将粘附细胞( $2 \times 10^6$ )以10000-15000个细胞/载体的密度接种到生物反应器。培养12天后,3D-粘附细胞的密度达到150,000-250,000个细胞/载体或含有150个载体的生物反应器中 $22.5-37.5 \times 10^6$ 。

[0057] 图3A-B为描述比较在源自胎盘的3D-粘附细胞中表达的膜标记(暗紫色)与在常规2D培养条件下培养的胎盘细胞中的膜标记(淡紫色)的表达水平差异的条形图。粘附细胞在培养瓶(2D)中生长4-6周,或在生物反应器系统中于聚苯乙烯载体(3D)上生长2-3周。从培养瓶或载体收获细胞后,孵育细胞并与识别粘附细胞(图3A)或造血细胞(图3B)特有的膜标记的一组单克隆抗体(MAb)结合。注意到与在3D培养的粘附细胞中表达的MSC膜标记相比在2D培养细胞中的MSC膜标记表达(如对于CD90、CD 105、CD73和CD29膜标记所示)明显更高,尤其是CD 105,其在3D培养细胞中显示56%表达,相比较在2D培养细胞中为87%(图3A)。2D和3D二者培养物中的粘附细胞都不表达任何造血膜标记(图3B)。

[0058] 图4A-D为描述比较在2D和3D条件或在2D和3D条件培养基下培养的从胎盘产生的粘附细胞的蛋白质水平的条形图。图4A-C描述由ELISA分析以pg/ml(标准化为 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml)为单位的2D和3D培养的粘附细胞的条件培养基中的Flt-3配体(图4A)、IL-6(图4B)和SCF(图4C)的水平。结果代表三个独立实验之一。图4D显示不同细胞蛋白的表达水平,如用iTRAQ试剂标记其间比较的蛋白质样品的质谱法分析。蛋白样品采自在2D(白条)和3D(灰条)条件下生长的粘附细胞。该图代表两个重复实验之一。注意到细胞及2D和3D培养条件的条件培养基中某些蛋白的表达水平的差异。

[0059] 图5A-D为描述源自胎盘的3D-粘附细胞在体外分化为成骨细胞的能力的显微照片。将源自人胎盘的粘附细胞在成骨诱导培养基(含有10%FCS、100nM地塞米松、0.05mM抗坏血酸2-磷酸盐、10mM B-甘油磷酸盐的DMEM)中培养3周时间。图5A-B显示表达钙化基质的细胞,如Alizarin Red S染色所示。图5C-D显示不用成骨诱导培养基处理的对照细胞,其保持成纤维细胞样表型并证明没有矿化。

[0060] 图6为描述在移植后3.5周用化学疗法(连续2周腹腔内注射25mg/kg白消安(busulfan))治疗的NOD-SCID小鼠骨髓(BM)中检测的人CD45+细胞百分比的图表。将从源自脐带血的单核细胞纯化的CD34+细胞(100,000)单独移植(5只小鼠,a),或与在2D条件下培养的 $0.5 \times 10^6$ 个源自胎盘的粘附细胞共同移植(2D-粘附细胞;2只小鼠,b),或与在pluriX™生物反应器中3D条件下培养的源自胎盘的粘附细胞(3D-粘附细胞)共同移植(5只小鼠,c)。然后从小鼠大腿骨和胫骨收集BM。通过流式细胞计量术检测BM中的人细胞。通过将细胞与抗人CD45-FITC孵育来测定表达CD45的人细胞的百分比。注意到与单用HSC处理小鼠中的人类细胞的百分比(a)相比,与2D-粘附细胞(b)以及与3D-粘附细胞(c)共同移植的小鼠骨髓中的人细胞(hCD45+)的百分比更高。在经3D-粘附细胞培养细胞处理的小鼠中观察到比经2D-粘附细胞培养细胞处理的小鼠更高的移入,表明了经3D培养的粘附细胞所特有的更高治疗优势。

[0061] 图7A-B是仅用CD34+细胞移植的小鼠中的人移植CD45+细胞(图7A)与CD34+细胞加源自脂肪组织的粘附细胞(图7B)比较的FACS分析。注意到与单用人CD34+处理的小鼠(7B-12%)相比,用源自脂肪组织的粘附细胞共同移植的小鼠中的人造血细胞群(hCD45+)

百分比 (7A-29%) 显著更高。

[0062] 图8A为描述在人脐带血单核细胞 (CB) 与等量经辐射 (3000Rad) 脐带血细胞 (iCB)、源自人外周血的单核细胞 (PBMC)、2D培养的 (2D) 或3D培养的 (3D) 源自胎盘粘附细胞、或PBMC和2D及3D培养的源自胎盘粘附细胞的组合 (PBMC+2D和PBMC+3D) 之间进行混合淋巴细胞反应的条形图。CB细胞群的大小由<sup>3</sup>H-胸苷吸收 (以CPM测量) 来表示, 在培养的最后18小时内测量。受刺激的CB细胞增殖升高表明较高的免疫应答水平。注意到与粘附细胞孵育的细胞显示出较低的免疫应答水平, 特别是在与粘附细胞共同孵育时, 对PBMC的CB免疫应答减少。每一反应作三个重复。

[0063] 图8B为描述通过Celligen™从胎盘产生3D粘附细胞 (命名为PLX-C细胞) 的流程图。

[0064] 图8C为从New Brunswick Scientific网站调试的Celligen™生物反应器导管和端口的图解。

[0065] 图9A-B描述通过Plurix (命名为PLX, 图9B) 和Celligen (命名为PLX-C, 图9A) 进行3D粘附细胞生产的细胞循环分析。将细胞固定于70% EtOH 0.1N, 离心并重悬于碘化丙啶 (PI) 溶液, 然后通过FACS分析。

[0066] 图10A-C描述了PLX-C上的成纤维细胞-典型标记的表达而不是内皮典型标记的表达。图10A描述了内皮标记CD31的阴性表达; 图10B描述了内皮标记KDR的阴性表达; 及图10C描述了人成纤维细胞标记 (D7-FIB) 的阳性表达。注意到同种型IgG1 (FITC) 的红色直方图表示阴性对照而蓝色直方图表示阳性染色细胞。

[0067] 图11A-D描述了PLX-C细胞上刺激分子和共刺激分子的表达。图11A描述了CD80的PLX-C表达; 图11B描述了CD86的PLX-C表达; 图11C描述了CD40的PLX-C表达, 及图11D描述了HLA-A/B/C的PLX-C表达。用相关同种型荧光分子制备阴性对照。注意到红色直方图表示表达PLX-C标记的细胞群, 蓝色直方图表示表达骨髓 (BM) 标记的细胞群, 且绿色直方图表示表达单核细胞 (MNC) 标记的细胞群。

[0068] 图12A-B描述了PLX-C对淋巴细胞增殖的抑制。图12A描述了利用用等量的经辐射的 (3000Rad) 源自PB的MNC (供体B) 刺激 $2 \times 10^5$ 个源自外周血 (PB) 的MNC (供体A) 然后向培养物中加入渐增量的PLX-C细胞进行的MLR检测。将各组的三个重复接种于96孔板中。通过<sup>3</sup>H胸苷掺入测量增殖速率; 图12B描述用ConA (1.5mg/ml) 刺激的源自外周血 (PB) 的MNC。向培养物中加入渐增量的PLX-C细胞。将各组的三个重复接种于96孔板中。通过<sup>3</sup>H胸苷掺入测量增殖速率。

[0069] 图13A-C描述了与外周血细胞共培养后促炎症反应和抗炎症反应细胞因子分泌的PLX-C调节。图13A-B描述了用ConA刺激的源自人的MNC (分离自外周血) 与PLX-C共培养后IFN $\gamma$  (图13A) 和TNF $\alpha$  (图13B) 的分泌; 图13C描述了用LPS刺激的源自人的MNC (分离自外周血) 与PLX-C共培养后IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 和IL-10的分泌。收集上清并采用ELISA进行细胞因子分析。

[0070] 图14描述了用于感染PLX-C细胞的萤光素酶表达载体。来自OmicsLink的表达载体Lv33用于本文。将该萤光素基因克隆至ORF。

[0071] 图15描述了感染的PLX-C细胞的高萤光素酶表达。用萤光素酶表达载体感染细胞并在感染后48小时通过IVIS系统使其可视化。注意到细胞显示高水平的萤光素酶表达。

[0072] 图16A-D描述了给SCID/Beige小鼠注射 $2 \times 10^6$ 个表达萤光素酶的PLX-C细胞。一只



小鼠IM注射,一只IV注射。采用IVIS系统监测被注射小鼠以评价PLX-C的体内生物分布。显示第1天(图16A)、第4天(图16B)、第6天(图16C)和第22天(图16D)的IVIS结果。

[0073] 图17为描述用本发明粘附细胞(命名为PLX-C)治疗的小鼠的髁和足灌注增加的图。该图描述了小鼠髁和足灌注百分数的中值。采用非接触激光多普勒仪在手术后第0、6、9、14和21天(显示的为第21天的测量值)从两边测量髁和足的血流。结果表示为试验中缺血肢血流与正常肢血流的比。

[0074] 图18为描述肢体功能和缺血损伤的体内评价的图。采用以下评分系统连续进行缺血肢受损用途的半定量评价:3=拖足,2=无拖足但无跖屈,1=跖屈,以及0=弯曲脚趾以抵抗对尾巴的轻微牵引。

[0075] 图19A-C描述了PLX-C处理后增加的毛细血管密度。图19A描述了用PBS处理的小鼠的毛细血管密度;图19B描述了用PLX-C细胞处理的小鼠的毛细血管密度;图19C为描述每个肌肉细胞毛细血管数量的条形图。注意到在由特异毛细血管染色验证的诱导的肢体缺血后,在PLX-C处理小鼠中而不是在对照小鼠中观察到增加的毛细血管密度。

[0076] 图20A-B描述了PLX-C给药后减少的氧化应激和内皮炎症。图20A为描述氧化应激(硝基酪氨酸染色)的条形图;及图20B为描述内皮炎症(VCAM评价)的条形图。注意到在用PLX-C处理的小鼠中观察到减少的氧化应激和内皮炎症。

#### [0077] 发明实施方案描述

[0078] 在一些实施方案中本发明为使用胎盘或脂肪组织的粘附细胞增加组织中血管生成和治疗缺血或需要结缔组织再生和/或修复的医学状况的方法。

[0079] 通过参考附图和附加说明可更好地理解本发明的原理和操作。

[0080] 在详细解释本发明至少一个实施方案之前,应理解的是本发明的应用不受限于以下说明所列出的或实施例所例证的详细内容。本发明可具有其他实施方案或以各种方式实施或进行。而且,也应理解的是本文应用的措辞和术语用于描述目的且不应被认为具有限制性。

[0081] 在将本发明付诸实施时,本发明人已发现源自胎盘或脂肪组织的粘附细胞在增加组织中血管生成和治疗缺血和需要结缔组织再生和/或修复的医学状况中高度有效。

[0082] 如下文和之后的实施例部分的实施例1-8所证明,本发明人可扩增包含基质干细胞性质的源自脂肪和胎盘的粘附细胞。发现据此扩增的细胞在冷冻保藏后具有活力,如粘附性和再增殖测定法所证明(见实施例1)。源自胎盘的粘附细胞的流式细胞计量术分析揭示了不同的标记表达类型(见图3A-B)。如下文实施例部分的实施例6中进一步显示,移植源自胎盘的粘附细胞显著诱导被动脉结扎(缺血后肢模型)的小鼠髁和足的血流(图17),显著改善肢体功能(图18),增加毛细血管密度(图19A-C)且减少氧化应激和内皮炎症(图20A-B)。

[0083] 因此,根据本发明的一方面提供了增加组织中血管生成的方法。该方法通过使组织与选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞接触实现,藉此增加组织中的血管生成。

[0084] 本文所用短语“增加组织中的血管生成”指增加(诱导、上调)组织中生成新毛细血管的过程。

[0085] 本文所用短语“粘附细胞”指锚着依赖即需要附着在表面上以体外生长的均质或异质细胞群。

[0086] 本文所用短语“脂肪组织”指包含脂肪细胞(脂细胞)的结缔组织。

[0087] 本文所用术语“胎盘组织”指为子宫壁衬里并在怀孕期间包裹胎儿的哺乳动物雌性器官的任何部分,胎盘和胎儿通过脐带连接。出生后胎盘剥离(称为产后胎盘)。在一个示例性实施方案中,胎盘指完整的胎盘。

[0088] 源自胎盘或脂肪组织的粘附细胞可使用二维或三维培养条件增殖。

[0089] 在2D培养中增殖粘附细胞的条件进一步描述于下文和之后的实施例部分。

[0090] 本文所用短语“三维培养”指将细胞置于与细胞生长相容同时使得细胞可以在多于一层上生长的条件。已很好的认识到细胞在活生物体(或组织)中的原位环境在三维构造中。细胞被其它细胞围绕。它们被固定在使得可建立各种局部微环境的纳米级胞外基质纤维的复合网络中。它们的胞外配体不仅介导对基底膜的附着,而且还可及多种血管和淋巴管。氧、激素和营养素被运送到细胞而废物则被运出。本发明三维培养条件设计为模拟例如以下进一步例证的环境。

[0091] 应理解的是三维培养条件使能够扩增粘附细胞。

[0092] 本文所用术语“扩增的”和“扩增”指基本上不分化地维持细胞及最终细胞生长,即使细胞群增加(例如至少2倍)而不存在伴随所述增加的分化。

[0093] 本文所用术语“维持的”和“维持”指基本上不分化的细胞更新,即基本上稳定细胞群而不存在伴随所述稳定的分化。

[0094] 如所述,本发明这一方面的粘附细胞回收自脂肪或胎盘组织。

[0095] 可从足月或早产胎盘得到胎盘细胞。优选一旦外出血就收集胎盘。优选以足够除去残留细胞的时间灌注胎盘。本文所用术语“灌注”指将流体倾注或使流体通过器官或组织的行为。胎盘组织可来自任何哺乳动物;例如人的胎盘组织。方便的胎盘组织来源是来自产后胎盘(例如1-6小时),然而,胎盘组织或细胞的来源或分离胎盘组织的方法对于本发明而言并不重要。

[0096] 源自胎盘的粘附细胞可来自胎盘的胎儿(即羊膜或胎盘内部部分,参见实施例1)和母体(即基蜕膜和壁蜕膜)部分。在生理缓冲液[例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或Hank's缓冲液]中洗涤组织样品。通过用消化酶处理组织(参见下文)或/和切碎(mince)并用洗涤介质将组织部分冲洗过尼龙滤器或通过轻轻吸移(Falcon, Becton, Dickinson, San Jose, CA),制备单细胞悬浮液。

[0097] 源自脂肪组织的粘附细胞可通过本领域技术人员已知的多种方法来分离。例如,这样的方法阐述于美国专利第6,153,432号。脂肪组织可源自网膜/内脏、乳房、性腺或其它脂肪组织部位。脂肪组织的一种来源为网膜脂肪。在人类中,脂肪通常通过吸脂来分离。

[0098] 源自脂肪组织的分离粘附细胞可通过在如下条件处理组织得到:用消化酶(例如胶原酶、胰蛋白酶和/或分散酶;和/或有效浓度的透明质酸酶或DNA酶);和乙二胺四乙酸(EDTA);在25-50℃的温度作用10分钟到3小时。然后可以让细胞通过20微米-1毫米的尼龙或粗棉布网滤器。然后让细胞直接在培养基中或经过Ficoll或Percoll或其它颗粒梯度进行差速离心。细胞在4-50℃的温度以100-3000x g速度离心1分钟至1小时(参见美国专利第7,078,230号)。

[0099] 除源自胎盘或脂肪组织的粘附细胞外,本发明还设想特征为基质干细胞表型(其将在下文进一步阐述)的来自其它细胞来源的粘附细胞的用途。可从其中提取粘附细胞的

组织来源包括但不限于：脐带血、头皮、毛囊[例如美国专利申请第20060172304号所述]、睾丸[例如Guan K.等,Nature.2006 Apr 27;440(7088):1199-203所述]、人嗅觉粘膜[例如Marshall,CT.等,Histol Histopathol.2006Jun:21(6):633-43所述]、胚胎卵黄囊[例如Geijsen N,Nature.2004Jan 8;427(6970):148-54所述]和羊水[Pieternella等(2004)Stem Cells.22:1338-1345],已知它们所有的都包含间充质干细胞。来自这些组织来源的粘附细胞可以通过使这些细胞在粘附表面上培养分离,藉此从原始群中的其它细胞分离出粘附细胞。

[0100] 无论来源(例如胎盘或脂肪组织),优选在无菌条件下提取细胞。一旦得到分离的细胞,就使其粘附到粘附材料(例如构成表面)上,藉此分离粘附细胞。培养可在如实施例部分的实施例4描述的2D条件下进行且细胞可进一步转移至3D条件。

[0101] 本文所用“粘附材料”指具有可让细胞保持在表面的化学结构(例如,带电荷的表面暴露基团)的人工合成、天然存在或其组合的无细胞毒性(即生物相容)材料。

[0102] 可用于本发明这方面的粘附材料的实例包括但不限于:聚酯、聚丙烯、聚链烯、聚氟氯乙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜、醋酸纤维素、玻璃纤维、陶瓷颗粒、matrigel、胞外基质组分(例如纤维粘连蛋白、软骨粘连蛋白、层粘连蛋白)、胶原、聚L乳酸和惰性金属纤维。

[0103] 用本领域熟知方法可实现进一步纯化或富集基质干细胞的步骤(例如通过采用基质干细胞标记表达的FACS,其在下文进一步阐述)。

[0104] 用于本发明培养的基础培养基的非限制性实例包括极限必须培养基Eagle、ADC-1、LPM(无牛血清白蛋白)、F10(HAM)、F12(HAM)、DCCM1、DCCM2、RPMI 1640、BGJ培养基(进行和不进行Fitton-Jackson改良)、基本培养基Eagle(BME-加入Earle's盐基质)、Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM-无血清)、Yamane、IMEM-20、Glasgow改良Eagle培养基(GMEM)、Leibovitz L-15培养基、McCoy's 5A培养基、培养基M199(M199E-含Earle's盐基质)、培养基M199(M 199H-含Hank's盐基质)、极限必须培养基Eagle(MEM-E-含Earle's盐基质)、极限必须培养基Eagle(MEM-H-含Hank's盐基质)和极限必须培养基Eagle(MEM-NAA,含非必须氨基酸),在数目众多的其他培养基中包括:培养基199、CMRL 1415、CMRL 1969、CMRL 1066、NCTC 135、MB 75261、MAB 8713、DM 145、Williams'G、Neuman&Tytell、Higuchi、MCDB 301、MCDB 202、MCDB 501、MCDB 401、MCDB 411、MDBC 153。用于本发明的优选培养基为DMEM。这些和其它有用的培养基购自GIBCO,Grand Island,N.Y.,USA和Biological Industries,Bet HaEmek,Israel等等。大量这些培养基概述于Methods in Enzymology,第LVIII卷,“Cell Culture”,第6272页,William B.Jakoby和Ira H.Pastan编辑,Academic Press,Inc.出版。

[0105] 培养基可添加例如血清(例如牛或其它物种的胎血清)和任选或备选以皮克/ml-毫克/ml水平浓度的生长因子、维生素(例如抗坏血酸)、细胞因子、盐(例如B-甘油磷酸盐)、类固醇(例如地塞米松)以及激素(例如生长激素、促红细胞生成素、促血小板生成素、白介素3、白介素6、白介素7、巨噬细胞集落刺激因子、c-kit配体/干细胞因子、骨保护素配体、胰岛素、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子、睫状神经营养因子、血小板源生长因子和骨形态发生蛋白)。

[0106] 应进一步认识到可将另外组分加入培养基中。这样的组分可为抗生素、抗真菌素、白蛋白、氨基酸和本领域已知用于细胞培养的其它组分。此外,需要时可加入组分以增强分

化过程(参见以下进一步阐述)。

[0107] 应理解的是当本发明粘附细胞给予人受试者时,细胞和培养基(例如,含有上述培养基添加剂)应基本上不含异源成分,即没有任何动物污染物例如支原体。例如,培养基可添加血清替代物、人血清和/或合成或重组产生的因子。

[0108] 如本文所述,一旦取得粘附细胞就可将其传代到二维或三维环境(参见以下实施例部分的实施例1和4)。但是应该了解,可在分离后立即将所述细胞转移到3D构造基质中或在二维条件之后传代到三维环境(如上文所述)。

[0109] 因此,配置本发明这方面的粘附材料用于3D培养,藉此提供基本上增加用于细胞粘附的可用附着表面的生长基质,以便模拟组织(例如胎盘)的基础结构。

[0110] 对于大规模生产,可在3D生物反应器中实现培养。

[0111] 这样的物反应器实例包括但不限于活塞流动生物反应器、连续搅拌罐生物反应器、固定床生物反应器、CelliGen Plus® 生物反应器系统(New Brunswick Scientific (NBS))或BIOFLO 310生物反应器系统(New Brunswick Scientific (NBS))。

[0112] 如实施例部分的实施例4所示,Celligen生物反应器可在可控条件下(例如,pH、温度和氧气水平)且利用恒定的细胞生长培养基灌注来3D扩增粘附细胞。而且,可直接监测细胞培养物的葡萄糖、乳酸盐、谷氨酰胺、谷氨酸和铵的浓度水平。粘附细胞的葡萄糖消耗速率和乳酸盐形成速率使得可以测量细胞生长速率并确定收获时间。

[0113] 可用于本发明的其它3D生物反应器包括但不限于连续搅拌罐生物反应器,其中使培养基连续进料到生物反应器中,将产物连续抽出,以维持反应器内的时间恒定稳态。带有纤维床篮的搅拌罐生物反应器可购自例如New Brunswick Scientific Co.Edison,NJ、固定床生物反应器、气升式生物反应器(其中空气通常通入中央导管的底部,向上流动同时形成气泡,在柱顶分离废气)、含有Polyactive泡沫的细胞接种灌注式生物反应器(如Wendt, D.等,Biotechnol Bioeng 84:205-214, (2003) 所述)、管状聚L乳酸(PLLA)多孔支架径向流灌注式生物反应器[如Kitagawa等,Biotechnology and Bioengineering 93(5):947-954 (2006) 所述]。可根据本发明使用的其它生物反应器阐述于美国专利第6,277,151号、第6197,575号、第6139,578号、第6132,463号、第5902,741号和第5,629,186号。

[0114] 接种时优选细胞接种达到100,000-1,500,000个细胞/mm。在一个示例性实施方案中,接种共 $150 \pm 30 \times 10^6$ 个细胞,接种 $3-5 \times 10^6$ 个细胞/gr载体,或接种 $0.015-0.1 \times 10^6$ 个细胞/ml。

[0115] 当至少约10%的细胞增殖时收获细胞且同时避免不可控的分化和衰老。

[0116] 培养进行至少约2天、3天、4天、5天、10天、20天、1个月或甚至更长。应该了解,在生物反应器中的培养可能延长这一时间。在3D培养中培养粘附细胞可在连续流入培养基下实现。也可进行传代以增加细胞数目。应了解的是可改变培养基以延长和改进培养条件。

[0117] 本发明一些实施方案的粘附细胞包含至少约10%、28%、30%、50%、80%或更多的增殖性细胞(可通过监测S和G2/M期的FACS测定)。

[0118] 本发明一些实施方案的粘附细胞可包含至少一种“基质干细胞表型”。

[0119] 本文所用“基质干细胞表型”指源自骨髓的基质(即间充质)干细胞的典型结构或功能表型。

[0120] 本文所用短语“干细胞”指没有终末分化的细胞。

[0121] 因此,例如,细胞可能具有纺锤形。作为备选或另外,细胞可表达基质干细胞典型的一种或一群标记(例如表面标记)。基质干细胞表面标记(阳性和阴性)的实例包括但不限于CD105+、CD29+、CD44+、CD73+、CD90+、CD3-、CD4-、CD34-、CD45-、CD80-、CD19-、CD5-、CD20-、CD11B-、CD14-、CD19-、CD79-、HLA-DR-和FMC7-。其它基质干细胞标记包括但不限于酪氨酸羟化酶、巢蛋白和H-NF。

[0122] 根据本发明教导产生的胎盘组织的粘附细胞具有基本上如下文实施例部分的实施例4描述的基因表达概况。

[0123] 基质干细胞典型的功能表型实例包括但不限于T细胞抑制活性(不刺激T细胞而相反地对其抑制)、造血干细胞支持活性以及成脂肪、成肝、成骨和成神经分化之任一。

[0124] 任意这些结构或功能特征可用于证明本发明细胞合格(见下文实施例部分的实施例4)。

[0125] 根据本发明教导产生的细胞群特征为独特的蛋白质表达概况,如实施例部分的实施例1所示。因此,例如,根据本发明教导产生的胎盘或脂肪组织的粘附细胞能够表达和/或分泌高水平的所选择因子。例如,这样的细胞表达或分泌的SCF、Flt-3、H2A组蛋白家族(H2AF)或醛脱氢酶X(ALDH X)为在2D培养中生长的胎盘或脂肪组织的粘附细胞表达或分泌的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或甚至12倍。另外或作为备选,本发明细胞群分泌或表达IL-6、真核翻译延伸因子(EF2)、网钙结合蛋白3、EF-手钙结合结构域(RCN2)或钙调蛋白1碱性平滑肌(CNN1)的水平为在2D培养中生长的胎盘或脂肪组织的粘附细胞表达或分泌的至少2、3或5倍。另外或作为备选,本发明细胞群的特征为与2D培养的其他蛋白表达水平较低。因此,例如,分泌或表达低于0.6、0.5、0.25或0.125的在2D培养中生长的胎盘或脂肪组织的粘附细胞表达或分泌的异源细胞核糖核蛋白H1(Hnrph1)、CD44抗原同种型2前体、3磷酸腺苷5磷酸硫酸合酶2同种型a(Papss2)或核糖体蛋白L7a(rpL7a)的表达水平。

[0126] 如下文实施例部分的实施例3-4所示,粘附细胞尤其是3D-粘附细胞显示可抑制混合淋巴细胞反应(MLR)测定中人脐带血单核细胞的免疫反应,因此显示可优选用于临床的生物活性(例如,T细胞抑制活性、造血干细胞支持活性)。

[0127] 根据本发明的一个实施方案,本发明的粘附细胞可抑制受试者中的免疫反应。

[0128] 本文所用短语“抑制受试者中的免疫反应”指降低或抑制发生在受试者中响应抗原(例如,外源细胞或其部分)的免疫反应。可被粘附细胞抑制的免疫应答包括体液免疫应答和细胞免疫应答,其分别涉及通过抗体和T-淋巴细胞(T细胞的增殖)特异识别病原体抗原。

[0129] 根据本发明的一个实施方案,本发明粘附细胞的的特征为比生长在二维(2D)培养中的胎盘或脂肪组织的粘附细胞更高的免疫抑制活性。

[0130] 根据本发明的一个实施方案,该免疫抑制活性包括T细胞增殖减少。

[0131] 如上文所述和下文实施例部分的实施例6所述,本发明的粘附细胞诱导体内血管生成(例如髓和腿中的血流)、显著改善动脉结扎动物的肢体功能、增加毛细血管密度并降低氧化应激和内皮炎症。而且,如下文实施例部分的实施例7详细描述,本发明粘附细胞显著改善大鼠模型中从中风的恢复。

[0132] 因此,根据本发明另一方面,提供治疗需要其的受试者中缺血的方法。该方法通过

给予所述受试者治疗有效量的本发明粘附细胞实现,藉此治疗该受试者的缺血。

[0133] 本文所用术语“缺血”指特征为血管生成不足或与其相关的任何病理(疾病、状况、综合征或病症)。实例包括但不限于外周动脉病(PAD)例如肢体缺血和严重肢体缺血(CLI)、缺血性心脏病、缺血性脑病(例如中风)、创伤愈合延迟、溃疡愈合延迟、生殖相关病症、动脉硬化、缺血性血管疾病、缺血性心脏病、心肌缺血、冠状动脉病(CAD)、动脉粥样硬化心血管疾病、冠状动脉左总干病、动脉阻塞性疾病、外周缺血、外周血管病、肾血管病、外周动脉病、肢体缺血、下肢缺血、脑缺血、脑血管病、视网膜病、视网膜修复、重建障碍、von Hippel-Lindau综合征、遗传性出血性telangiectasia缺血性血管病、Buerger病、缺血性肾病以及缺血胎盘。

[0134] 本文所用术语“治疗”指抑制或阻止病理(例如缺血)的发展和/或引起病理的减少、减轻或退行。本领域技术人员将理解可使用各种方法学和测定法评价病理的发展,且相似地,各种方法学和测定法可用于评价病理的减少、减轻或退行。术语“治疗”也可指缓解或减少与该病理相关的症状。

[0135] 本文所用术语“需要其的受试者”指任何受试者(例如,哺乳动物),例如被诊断出或患有该病理的人类受试者。

[0136] 如上文所述和下文实施例部分的实施例8所述,本发明人已发现本发明的粘附细胞可使结缔组织再生和/或修复。

[0137] 因此,根据本发明的另一方面,提供了治疗需要其的受试者中需要结缔组织再生和/或修复的医学状况的方法。该方法通过给予受试者治疗有效量的本发明粘附细胞实现。

[0138] 术语“结缔组织”指包含胶原束、弹性纤维(例如,肌肉和血管之间和周围)和简单细胞的支撑框架组织。结缔组织的实例包括但不限于密质结缔组织(例如,韧带、腱、牙周韧带)、蜂窝结缔组织(例如,具有蛋白质性质的纤维如胶原和弹力蛋白)、网状结缔组织、脂肪组织、血、骨、软骨、皮肤、椎间盘、牙髓、牙本质、牙龈、细胞外基质(ECM)-形成细胞、疏松结缔组织和平滑肌细胞。

[0139] 本文所用短语“需要结缔组织再生和/或修复的医学状况”指以结缔组织受损(即,非功能组织、癌性的或癌前期组织、破裂组织、断裂组织、纤维变性组织或缺血组织)或丧失(例如创伤、感染性疾病、遗传病等后)为特征的病理。该病理的非限制性实例包括骨折、骨癌(例如骨肉瘤、骨癌转移)、烧伤创面、关节软骨缺损和深层创伤。

[0140] 术语“给予受试者”指将本发明细胞引入靶组织。这些细胞可源自接受者或来自同种异体或异种供体。这一短语也涵盖将本发明细胞“移植”、“细胞替换”或“移入”受试者中。

[0141] 该受试者可为需要结缔组织再生和/或修复的任意哺乳动物,包括例如人或家养动物,包括但是不限于马(即马科)、牛、山羊、绵羊、猪、狗、猫、骆驼、羊驼、美洲驼和牦牛。

[0142] 根据本发明的一个实施方案,本发明的粘附细胞可用于治疗包括以下的状况:软骨下骨囊肿、骨折、骨质疏松症、骨关节炎、退化骨、各种结缔组织丧失相关的癌症(例如,骨癌、骨肉瘤、骨转移)、软骨损伤、关节软骨缺损、视乳头变性疾病、成骨不全(OI)、烧伤、烧伤创面、深层创伤、创伤愈合延迟、韧带受损以及腱受损,例如马和其他需要其的受试者(如上文所述)中由过度劳累引起的腱损伤。

[0143] 根据本发明这一方面给予的细胞包括上述可在三维或二维环境中培养的粘附细胞及其间充质和非间充质的部分或终末分化的衍生物。

[0144] 从本发明基质干细胞中衍生谱系特异细胞的方法为本领域熟知。参见例如美国专利第5,486,359号、第5,942,225号、第5,736,396号、第5,908,784号和第5,902,741号。

[0145] 这些细胞可为首次用于实验的或经遗传修饰的以衍生目标谱系(参见美国专利申请第20030219423号)。

[0146] 这些细胞可为自体或非自体来源(即同种异体或异种)的新鲜或冷冻(例如,冷冻保藏)制备物。

[0147] 根据医学状况,可给予受试者其他的化学药物(例如免疫调节的、化学疗法等)或细胞。

[0148] 因为非自体细胞在给予身体时会诱导免疫反应,所以已研发了数种方法以降低排斥非自体细胞的可能性。这些包括抑制受者的免疫系统或在移植前将非自体细胞胶囊化在免疫隔离的半透膜中。

[0149] 胶囊化(encapsulation)技术通常分类为微胶囊化,其涉及小的球状载体,和大胶囊化(macroencapsulation),其涉及较大的平板中空纤维膜(Uludag,H.等,Technology of mammalian cell encapsulation.Adv Drug Deliv Rev.2000;42:29-64)。

[0150] 制备微胶囊的方法为本领域已知,包括例如如下公开的方法:Lu MZ等,Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxybenzylidene-acetylated poly(allylamine).Biotechnol Bioeng.2000,70:479-83,Chang TM and Prakash S.Procedures for microencapsulation of enzymes,cells and genetically engineered microorganisms.Mol Biotechnol.2001,17:249-60和Lu MZ等,A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanobenzylideneacetate).J Microencapsul.2000,17:245-51。

[0151] 例如,通过将改良的胶原与甲基丙烯酸2-羟乙酯(HEMA)、甲基丙烯酸(MAA)和甲基丙烯酸甲酯(MMA)的三元聚合物壳络合来制备微胶囊,得到2-5 $\mu$ m的胶囊厚度。这样的微胶囊可进一步用另外的2-5 $\mu$ m三元聚合物壳包裹,以提供带负电荷的光滑表面并使血浆蛋白吸收最小化(Chia,S.M.等,Multi-layered microcapsules for cell encapsulation Biomaterials.2002 23:849-56)。

[0152] 其它微胶囊基于藻酸盐、海洋多糖(Sambanis,A.Encapsulated islets in diabetes treatment.Diabetes Technol.Ther.2003,5:665-8)或其衍生物。例如,可通过在氯化钙存在下聚阴离子藻酸钠和纤维素硫酸钠与聚阳离子聚(亚甲基共脒)盐酸盐之间的聚电解质络合作用来制备微胶囊。

[0153] 应了解,当使用较小的胶囊时改进了细胞胶囊化。因此,当胶囊大小从1mm减小到400 $\mu$ m时,胶囊化细胞的质量控制、机械稳定性、分散特性和体外活性都得到改进(Canaple L.等,Improving cell encapsulation through size control.J Biomater Sci Polym编辑.2002;13:783-96)。此外,发现孔径很好地控制在小至7nm的、表面化学经处理(tailored)的和精确微构造的纳米孔生物胶囊成功地为细胞免疫隔离出微环境(Williams D.Small is beautiful:microparticle and nanoparticle technology in medical devices.Med Device Technol.1999,10:6-9;Desai,T.A.Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation.Expert Opin Biol Ther.2002,2:633-46)。

[0154] 免疫抑制剂实例包括但不限于:氨甲蝶呤(methotrexate)、环磷酰胺

(cyclophosphamide)、环孢霉素(cyclosporine)、环孢霉素A(cyclosporin A)、氯喹(chloroquine)、羟氯喹、柳氮磺吡啶(sulfasalazine、sulphasalazopyrine)、金盐、D-青霉素(D-penicillamine)、来氟米特(leflunomide)、硫唑嘌呤(azathioprine)、阿那白滞素(anakinra)、英夫利昔单抗(infliximab) (REMICADE)、依那西普(etanercept)、TNF $\alpha$ 阻断剂、靶向炎性细胞因子的生物药物,和非固醇类抗炎药物(NSAID)。NSAID实例包括但不限于:乙酰水杨酸、水杨酸胆碱镁、二氟尼柳(diflunisal)、水杨酸镁、双水杨酸酯、水杨酸钠、双氯芬酸(diclofenac)、依托度酸、非诺洛芬(fenoprofen)、氟比洛芬(flurbiprofen)、吲哚美辛(indomethacin)、酮洛芬(ketoprofen)、酮咯酸、甲氯芬那酸酯、萘普生(naproxen)、萘丁美酮(nabumetone)、保泰松(phenylbutazone)、吡罗昔(phenylbutazone)、吡罗昔康(piroxicam)、舒林酸、托美丁(tolmetin)、对乙酰氨基酚(acetaminophen)、布洛芬(ibuprofen)、Cox-2抑制剂和曲马多(tramadol)。

[0155] 在本文所述任一方法中,可以给予细胞本身,或优选作为进一步包含药学上可接受载体的药物组合物的一部分来给予。

[0156] 本文所用“药物组合物”指含其它化学组分(例如药学上可接受的载体和赋形剂)的本发明粘附细胞(即选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞,其获自三维培养)的制剂。药物组合物的目的是方便将细胞给予受试者。

[0157] 下文所用术语“药学上可接受的载体”指载体或稀释剂,其不会引起对受试者的明显刺激,不消除所给予化合物的生物学活性和特性。载体的非限制性实例为丙二醇、盐水、乳液和有机溶剂与水的混合物。

[0158] 本文所用术语“赋形剂”指加到药物组合物中以进一步方便给予化合物的惰性物质。赋形剂的非限制性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0159] 根据本发明的优选实施方案,药学载体为水性盐溶液。

[0160] 配制和给予药物的技术可在“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack Publishing Co.,Easton,PA,最新版本中找到,其通过引用并入本文。

[0161] 可以全身方式给予药物组合物(如上文所述)。或者,可局部给予药物组合物,例如直接将药物组合物注射到患者的组织区。

[0162] 可通过本领域熟知的方法来制备本发明药物组合物,例如通过常规的混合、溶解、制粒、制成糖锭剂、研粉、乳化、胶囊化、包载或冻干的方法。

[0163] 因此,可用一种或更多种包含赋形剂和助剂的生理学上可接受的载体以常规方式来配制用于本发明的药物组合物,所述载体方便将活性成分加工成可在药学上使用的制剂。合适的制剂取决于所选择的给药途径。

[0164] 对于注射而言,可在水溶液中配制药物组合物的活性成分,优选生理上相容的缓冲液例如Hank's溶液、Ringer's溶液、生理盐缓冲液或包含冷冻保护剂的冷冻介质。对于经粘膜给药而言,制剂中使用适于待渗透的屏障的渗透剂。这样的渗透剂通常为本领域所知。

[0165] 对于用于本发明方法中的任何制剂而言,可从体外和细胞培养测定中初步估计治疗有效量或剂量。优选在动物模型中调配剂量以达到所需的浓度或滴度。这样的信息可用于更准确地确定用于人的剂量。

[0166] 可通过体外标准药学方法在细胞培养或实验动物中测定本文所述活性成分的毒



性和疗效。

[0167] 从这些体外和细胞培养测定和动物研究中得到的数据可用于调配供人类使用的一系列剂量。剂量可视所用剂型和所用给药途径而变化。可通过个别医生考虑患者状况选择确切的制剂、给药途径和剂量(参见例如Fingl等,1975,The Pharmacological Basis of Therapeutics,第1章第1页)。例如,可对帕金森患者进行显示对治疗的阳性反应的改善的运动功能的症状监测。

[0168] 对于注射而言,可在水溶液中调配药物组合物的活性成分,优选生理上相容的缓冲液例如Hank's溶液、Ringer's溶液或生理盐缓冲液。

[0169] 可个别调整剂量和给药间隔,以使活性成分水平足以通过移植的细胞来有效调节神经递质合成。达到理想效果所需的剂量将视个体特征和给药途径而定。检测试验可用于测定血浆浓度。

[0170] 根据待治疗状况的严重程度和反应性,可单次或复数次给药,且疗程持续若干天到若干周,或达到减轻疾病状态。

[0171] 当然,待给予的组合物的量将视正接受治疗的个体、病痛的严重程度、给药方式、主治医生的判断等等而定。给药剂量和时间安排应该对仔细连续监测的个体状况变化做出反应。例如,基于监测的指征,将给予被治疗的帕金森患者足以缓解疾病症状的细胞量。

[0172] 韧带损伤模型包括但不限于使用间充质干细胞再建前十字韧带的兔子模型[Jit-Kheng等,Arthroscopy (2004) 20 (9) :899-910],用于前十字韧带修复的长效生物再吸收支架的山羊模型[Altman等,J Am Acad Orthop Surg. (2008) 16 (4) :177-187]。腱修复的模型包括但不限于自体间充质干细胞介导的腱修复的成体新西兰白兔模型[Awad等,Tissue Eng. (1999) 5 (3) :267-77]。骨修复模型描述于例如Stem Cells in Endocrinology, Humana Press (2005) 183-206,其描述了操作间充质干细胞用于骨修复。

[0173] 本发明细胞经移植后优选在患病区域存活一段时间(例如约1个月),以便观察治疗效果。

[0174] 包括调配在药物相容性载体中的本发明制剂在内的组合物可以经制备、置于合适的容器中;并标记用于指示状况的治疗。

[0175] 若有需要,本发明组合物可以存于包或分配装置(dispenser device)例如FDA批准的试剂盒中,其可包含含有活性成分的一个或更多个单位剂型。所述包可例如包含金属或塑料薄片,例如泡罩包(blister pack)。所述包或分配装置可附有给药说明。包或分配装置还可提供与由管理药物生产、使用或销售的政府机构规定的形式的容器有关的公告,所述公告反映该机构批准的组合物形式或人类给药或兽用给药形式。这样的公告例如可以由美国食品和药品管理局批准的处方药物标签或批准的产品说明书。

[0176] 本发明粘附细胞可适当地配制成可合适地包装为制备物品的药物组合物。该制备物品包括包装材料,其包括用于增加组织血管生成、治疗缺血和/或治疗需要结缔组织再生和/或修复的病理的标签;其中所述包装材料包装本发明粘附细胞。

[0177] 应了解的是本发明粘附细胞可诱导受试者中的免疫抑制和/或耐受。因此,该粘附细胞可用于治疗需要免疫抑制和/或耐受的任意状况、该状况包括但不限于自身免疫疾病和炎症疾病(包括急性和慢性炎症疾病),包括但不限于心血管疾病、类风湿病、腺病、胃肠道疾病、皮肤病、肝病、神经病、肌肉病、肾病、生殖相关疾病、结缔组织疾病和全身性疾病。

[0178] 自身免疫性心血管病的实例包括但不限于动脉粥样硬化 (Matsuura E.等, Lupus.1998;7Suppl 2:S135)、心肌梗塞 (Vaarala O.Lupus.1998;7 Suppl 2:S132)、血栓症 (Tincani A.等, Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9)、Wegener's 肉芽肿病、Takayasu's 动脉炎、Kawasaki 综合征 (Praprotnik S.等, Wien Klin Wochenschr 2000Aug 25;112(15-16):660)、抗-VIII 因子自身免疫病 (Lacroix-Desmazes S.等, Semin Thromb Hemost.2000;26(2):157)、坏死性小血管炎、微小多脉管炎、Churg-Strauss 综合征、少免疫 (pauci-immune) 局灶性坏死性和新月体性肾小球肾炎 (Noel LH. Ann Med Interne (Paris).2000 May;151(3):178)、抗磷脂综合征 (Flamholz R.等, J Clin Apheresis 1999;14(4):171)、抗体诱导心力衰竭 (Wallukat G.等, Am J Cardiol.1999 Jun 17;83(12A):75H)、血小板减少性紫癜 (Moccia F. Ann Ital Med Int.1999 Apr-Jun;14(2):114; Semple JW.等, Blood 1996 May 15;87(10):4245)、自身免疫性溶血性贫血 (Efremov DG.等, Leuk Lymphoma 1998 Jan;28(3-4):285; Sallah S.等, Ann Hematol 1997 Mar;74(3):139)、Chagas 病中的心脏自身免疫 (Cunha-Neto E.等, J Clin Invest 1996 Oct 15;98(8):1709) 和抗-辅助T 淋巴细胞自身免疫 (Caporossi AP.等, Viral Immunol 1998;11(1):9)。

[0179] 自身免疫性类风湿病的实例包括但不限于类风湿性关节炎 (Krenn V.等, Histol Histopathol 2000 Jul;15(3):791; Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A 1994 Jan 18;91(2):437) 和强直性脊柱炎 (Jan Voswinkel等, Arthritis Res 2001;3(3):189)。

[0180] 自身免疫性腺病的实例包括但不限于胰病、I 型糖尿病、甲状腺病、格雷夫斯病、甲状腺炎、自发性自身免疫性甲状腺炎、Hashimoto's 甲状腺炎、特发性粘液性水肿、卵巢自身免疫、自身免疫性抗精子不育、自身免疫性前列腺炎以及 I 型自身免疫性多腺体综合征。疾病包括但不限于胰脏的自身免疫性疾病、I 型糖尿病 (Castano L. 和 Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647; Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34Suppl: S125)、自身免疫性甲状腺病、格雷夫斯病 (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29(2):339; Sakata S.等, Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92(1):77)、自发性自身免疫性甲状腺炎 (Braley-Mullen H. 和 Yu S, J Immunol 2000 Dec 15;165(12):7262)、Hashimoto's 甲状腺炎 (Toyoda N.等, Nippon Rinsho 1999 Aug;57(8):1810)、特发性粘液性水肿 (Mitsuma T. Nippon Rinsho.1999 Aug;57(8):1759)、卵巢自身免疫 (Garza KM.等, J Reprod Immunol 1998 Feb;37(2):87)、自身免疫性抗精子不育 (Diekman AB.等, Am J Reprod Immunol.2000 Mar;43(3):134)、自身免疫性前列腺炎 (Alexander RB.等, Urology 1997 Dec;50(6):893) 以及 I 型自身免疫性多腺体综合征 (Hara T.等, Blood.1991 Mar 1;77(5):1127)。

[0181] 自身免疫性胃肠道疾病的实例包括但不限于慢性炎性肠道疾病 (Garcia Herola A.等, Gastroenterol Hepatol.2000 Jan;23(1):16)、腹部疾病 (Landau YE. 和 Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16;138(2):122)、结肠炎、回肠炎和 Crohn's 病。

[0182] 自身免疫性皮肤病的实例包括但不限于自身免疫性大疱性皮肤病, 例如但不限于寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和落叶性天疱疮。

[0183] 自身免疫性肝病的实例包括但不限于肝炎, 自身免疫性慢性活动性肝炎 (Franco A.等, Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar;54(3):382)、原发性胆汁性肝硬变 (Jones

DE.Clin Sci (Colch) 1996 Nov;91 (5):551;Strassburg CP.等,Eur J Gastroenterol Hepatol.1999 Jun;11 (6):595) 和自身免疫性肝炎 (Manns MP.J Hepatol 2000 Aug;33 (2):326)。

[0184] 自身免疫性神经疾病的实例包括但不限于多发性硬化症 (Cross AH.等,J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112 (1-2):1)、阿尔茨海默氏病 (Oron L.等,J Neural Transm Suppl.1997;49:77)、重症肌无力 (Infante AJ.和Kraig E,Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83;Oshima M.等,Eur J Immunol 1990Dec;20 (12):2563)、神经病、运动神经病 (Kornberg AJ.J Clin Neurosci.2000 May;7 (3):191);格-巴二氏综合征和自身免疫性神经病 (Kusunoki S.Am J Med Sci.2000 Apr;319 (4):234)、肌无力、Lambert-Eaton肌无力综合征 (Takamori M.Am J Med Sci.2000 Apr;319 (4):204);副肿瘤性神经疾病、小脑萎缩、副肿瘤性小脑萎缩和僵人综合征 (Hiemstra HS.等,Proc Natl Acad Sci units S A 2001 Mar 27;98 (7):3988);非副肿瘤性僵人综合征、进行性小脑萎缩、脑炎、Rasmussen's 脑炎、肌萎缩性侧索硬化、Sydenham舞蹈病、抽动秽语综合征以及自身免疫性多内分泌病 (Antoine JC.和Honnorat J.Rev Neurol (Paris) 2000Jan;156 (1):23);免疫异常性神经病 (Nobile-Orazio E.等,Electroencephalogr Clin Neurophysiol增刊1999;50:419);获得性神经性肌强直、先天性多关节挛缩 (Vincent A.等,Ann N Y Acad Sci.1998 May 13;841:482)、神经炎、视神经炎 (Soderstrom M.等,J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57 (5):544) 以及神经变性疾病。

[0185] 自身免疫性肌肉疾病的实例包括但不限于肌炎、自身免疫性肌炎和原发性 Sjogren's 综合征 (Feist E.等,Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123 (1):92) 以及平滑肌自身免疫病 (Zauli D.等,Biomed Pharmacother 1999 Jun;53 (5-6):234)。

[0186] 自身免疫性肾病的实例包括但不限于肾炎和自身免疫性间质性肾炎 (Kelly CJ.J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1 (2):140)。

[0187] 生殖相关的自身免疫疾病的实例包括但不限于反复性胎儿流失 (fetal loss) (Tincani A.等,Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9)。

[0188] 自身免疫性结缔组织疾病的实例包括但不限于耳病、自身免疫性耳病 (Yoo TJ.等,Cell Immunol 1994 Aug;157 (1):249) 和内耳的自身免疫性疾病 (Gloddek B.等,Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266)。

[0189] 自身免疫性全身性疾病的实例包括但不限于全身性红斑狼疮 (Erikson J.等,Immunol Res 1998;17 (1-2):49) 和全身性硬化症 (Renaudineau Y.等,Clin Diagn Lab Immunol.1999 Mar;6 (2):156);Chan OT.等,Immunol Rev 1999 Jun;169:107)。

[0190] 此外,粘附细胞可用于治疗移植物移植相关的疾病,包括但不限于移植物排斥、慢性移植物排斥、亚急性移植物排斥、过急移植物排斥、急性移植物排斥和移植物抗宿主病。

[0191] 本文所用术语“约”指 $\pm 10\%$ 。

[0192] 在考察下文非限制性实施例之后,本发明的其他目的、优点和新特征对本领域技术人员而言将显而易见。此外,如上文描绘和下文权利要求部分所要求的每一本发明各种实施方案和方面可在下文的实施例中找到实验支持。

## 实施例

[0193] 现在参考以下实施例,其与上述说明一起以非限制方式阐明本发明。

[0194] 本文所用命名法和本发明所用的实验操作通常包括分子、生化、微生物学和重组DNA技术。这些技术在文献中有详尽的解释。参见例如:“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook等,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”第I-III卷,Ausubel,R.M.编辑(1994);Ausubel等,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley和Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley&Sons,New York(1988);Watson等,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren等(编辑)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,第1-4卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);如美国专利第4,666,828号、第4,683,202号、第4,801,531号、第5,192,659号和第5,272,057号提出的方法;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,第I-III卷Cellis,J.E.编辑(1994);“Current Protocols in Immunology”第I-III卷Coligan J.E.编辑(1994);Stites等(编辑),“Basic and Clinical Immunology”(第8版),Appleton& Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell和Shiigi(编辑),“Selected Methods in Cellular Immunology”,W.H.Freeman和Co.,New York(1980);有用的免疫测定法广泛阐述于专利和科学文献中,参见例如美国专利第3,791,932号、第3,839,153号、第3,850,752号、第3,850,578号、第3,853,987号、第3,867,517号、第3,879,262号、第3,901,654号、第3,935,074号、第3,984,533号、第3,996,345号、第4,034,074号、第4,098,876号、第4,879,219号、第5,011,771号和第5,281,521号;“Oligonucleotide Synthesis”Gait,M.J.编辑(1984);“Nucleic Acid Hybridization”Hames,B.D.,和Higgins S.J.编辑(1985);“Transcription and Translation”Hames,B.D.,和Higgins S.J.编辑(1984);“Animal Cell Culture”Freshney,R.I.编辑(1986);“Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press,(1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal,B.,(1984)和“Methods in Enzymology”第1-317卷,Academic Press;“PCR Protocols:A Guide To Methods and Applications”,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak等,“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press(1996);以上所有如同在本文完全阐述一样通过引用并于本文。贯穿本文献提供了其它一般的参考资料。认为其中的方法为本领域熟知,提供它们是为了方便读者。其中所包含的所有信息通过引用并于本文。

[0195] 实施例1

[0196] 从骨髓、胎盘和脂肪组织生产和培养粘附细胞

[0197] 在含3D载体的生物反应器系统中培养粘附细胞以产生3D-粘附细胞,其特征为特异的细胞标记表达概况。通过细胞计数检测生长效率。通过在分化培养基中培养检测这些细胞的分化能力。

[0198] 材料和实验操作

[0199] 骨髓粘附细胞-从正在进行心脏直视手术或BM活检的血液学健康的供者吸出的胸骨骨髓获得骨髓(BM)粘附细胞。将骨髓吸出物以Hank's平衡盐溶液(HBSS;GIBCO BRL/Invitrogen,Gaithersburg MD)稀释三倍并进行Ficoll-Hypaque(Robbins Scientific

Corp.Sunnyvale,CA) 密度梯度离心。之后,收集骨髓单核细胞( $<1.077\text{gm}/\text{cm}^3$ ),在HBSS中洗涤三次并重悬于生长培养基[添加了10%FCS(GIBCO BRL)、 $10^{-4}\text{M}$ 巯基乙醇(Merck,White House Station,NJ)、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物( $100\text{U}/\text{ml}:100\mu\text{g}/\text{ml}:1.25\text{un}/\text{ml}$ ; Beit Ha'Emek)、 $2\text{mM}$  L-谷氨酰胺(Beit Ha'Emek)的DMEM(Biological Industries,Beit Ha'emek,Israel)]。在组织培养瓶中(Corning,Acton,MA)于 $37^\circ\text{C}$  ( $5\%\text{CO}_2$ ) 分别培养来自各个供者的细胞,每周更换培养基。每3-4天用0.25%胰蛋白酶-EDTA(Beit Ha'Emek) 分裂细胞。传2-40代后,当达到60-80%汇合时,收集细胞用于分析或用于在生物反应器中的培养。

[0200] 源自胎盘的粘附细胞-在无菌条件下切下足月分娩胎盘的里面部分(Bnei Zion医学中心,Haifa,Israel),以Hank's缓冲液洗涤3次,于 $37^\circ\text{C}$ 与0.1%胶原酶( $1\text{mg}/\text{ml}$ 组织; Sigma-Aldrich,St.Lewis,MO) 孵育3小时。轻轻抽吸,然后用添加了10%FCS、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物( $100\text{U}/\text{ml}:100\mu\text{g}/\text{ml}:1.25\text{un}/\text{ml}$ ) 和 $2\text{mM}$  L-谷氨酰胺的DMEM洗涤悬浮的细胞,接种到 $75\text{cm}^2$ 培养瓶中并于 $37^\circ\text{C}$ 在 $5\%\text{CO}_2$ 增湿条件下于组织培养培养箱中孵育。此后使细胞在塑料表面粘附72小时,然后每3-4天换一次培养基。当达到60-80%汇合(通常10-12天)时,用0.25%胰蛋白酶-EDTA从生长培养瓶分离细胞,并接种到新培养瓶中。此后收集培养的细胞用于分析或用于在生物反应器中的培养。

[0201] 源自脂肪组织的粘附细胞-从吸脂操作的人脂肪组织(Rambam Haifa,Israel) 获得粘附细胞。用等体积的PBS彻底洗涤脂肪组织,用胶原酶( $20\text{mg}/\text{ml}$ ) 于 $37^\circ\text{C}$ 消化30分钟。然后用含有10%FCS、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物( $100\text{U}/\text{ml}:100\mu\text{g}/\text{ml}:1.25\text{un}/\text{ml}$ ) 和L-谷氨酰胺的DMEM洗涤细胞,以 $1200\text{rpm}$ 在室温(RT) 下离心10分钟,用裂解液重悬(1:10; Biological Industries,Beit Ha'emek,Israel,以弃掉红细胞),离心,用含有10%FCS、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物( $100\text{U}/\text{ml}:100\mu\text{g}/\text{ml}:1.25\text{un}/\text{ml}$ ) 和L-谷氨酰胺的DMEM重悬。然后以 $3-10\times 10^7$ 个细胞/培养瓶将洗涤过的细胞接种到无菌组织培养基培养瓶。第二天用PBS洗涤细胞以除掉残留的RBC和死细胞。于 $37^\circ\text{C}$ 在 $5\%\text{CO}_2$ 增湿条件下于组织培养培养箱中保持细胞。每3-4天更换培养基。在60-80%汇合时,用0.25%胰蛋白酶-EDTA从生长培养瓶分离细胞,并接种到新培养瓶中。传2-40代后,当达到60-80%汇合时,收集细胞用于分析或用于在生物反应器中的培养。

[0202] PluriX™活塞流动生物反应器-用由非编织纤维聚酯基质构成的1-100ml填充的3D porous载体(直径4mm) 装载PluriX™活塞流动生物反应器(Pluristem,Haifa,Israel; 如图1G所述,也参见美国专利第6,911,201号)。这些载体使得可在相对小的体积内繁殖大量细胞数。玻璃器皿由Pluristem(Pluristem,Haifa,Israel) 设计并制造。生物反应器保持于 $37^\circ\text{C}$ 培养箱中,且由阀门(图1G中的6a) 和蠕动泵(图1G中的9) 调节并监测流速。生物反应器包含取样和注射点(图1G中的4),使得可连续接种细胞。从库(图1G中的1) 中供给pH 6.7-7.4的培养基。向该库供给含有不同比例的空气/ $\text{CO}_2$ / $\text{O}_2$ (由生物反应器中的细胞密度而定) 的已过滤气体混合物(图1G中的2、3)。 $\text{O}_2$ 的比例适合生物反应器出口的溶 $\text{O}_2$ 水平,其由监测器(图1G中的6) 测定。经由硅酮管或扩散器(Degania Bet,Emek Hayarden,Israel) 将气体混合物提供给所述库。培养基流经能够收集循环中的非粘附细胞的分离容器(图1G中的7)。通过蠕动泵(图1G中的9) 使得培养基循环。生物反应器进一步配有附加的取样点(图1G中的10) 和用于连续交换培养基的容器。

[0203] 生产3D-粘附细胞-用胰蛋白酶处理按上文所述培养的非汇合原代人粘附2D细胞

培养物,洗涤,重悬在添加了10%FBS、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物(100U/ml:100ug/ml:1.25un/ml)和2mM L-谷氨酰胺的DMEM中,经由注射点接种( $10^3$ - $10^5$ 个细胞/ml)到无菌活塞流动生物反应器(参见图1G)中的3D载体上。接种前将PBS-Ca-Mg(Biological Industries,Beit Ha'emek,Israel)填入生物反应器,高压灭菌(120℃,30分钟),用含有10%热灭活的胎牛血清和青霉素-链霉素-制霉菌素混合物(100U/ml:100ug/ml:1.25un/ml)的Dulbecco's生长培养基洗涤。流速保持在0.1-5ml/分钟。接种过程涉及停止循环2-48小时,藉此使得细胞沉积到载体上。生物反应器保持在受控的温度(37℃)和pH条件(pH=6.7-7.4)下;根据需要使用供给无菌空气和CO<sub>2</sub>的培养箱。每周置换2-3次生长培养基。用新鲜的DMEM培养基每4小时至7天替换循环培养基。在密度为 $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ 个细胞/ml(生长后12-40天)时,从生物反应器去除总培养基体积,用PBS将生物反应器和载体洗涤3-5次。然后用胰蛋白酶-EDTA从载体分离3D-粘附细胞;(Biological Industries,Beit Ha'emek,Israel;轻轻振荡3-15分钟,1-5次),此后重悬于DMEM并冷冻保藏。

[0204] 3D-粘附细胞质量生物学测定-解冻并计数冷冻保藏的3D-粘附细胞。为评估细胞生存力,将 $2 \times 10^5$ 个细胞接种到150cm<sup>2</sup>的组织培养培养瓶中,在接种后7天内评估其粘附能力和再增殖。此后用荧光单克隆抗体流式细胞仪(Beckman Coulter,Fullerton,CA)分析3D-粘附细胞膜标记表型。

[0205] 用流式细胞术测定法比较3D和2D培养的粘附细胞的细胞膜标记概况。将来自2D培养物和3D流动系统培养物中的100,000-200,000个粘附细胞悬浮于5ml试管中的0.1ml培养基中,与饱和浓度的下述各MAb孵育(4℃,30分钟,暗环境):FITC-缀合的抗人CD90(Chemicon International公司,Temecula,CA)、PE缀合的抗人CD73(Bactlab Diagnostic,Ceasarea,Israel)、PE缀合的抗人CD105(eBioscience,San Diego,CA)、FITC缀合的抗人CD29(eBioscience,San Diego,CA)、Cy7-PE缀合的抗人CD45(eBioscience)、PE缀合的抗人CD19(IQProducts,Groningen,The Netherlands)、PE缀合的抗人CD14 Mab(IQProducts)、FITC缀合的抗人CD11b(IQProducts)和PE缀合的抗人CD34(IQProducts)或FITC缀合的抗人HLA-DR Mab(IQProducts)。孵育后在包含1%热灭活的FCS的冰冷PBS中洗涤细胞两次,重悬于500μl 0.5%甲醛中,用FC-500流式细胞仪(Beckman Coulter,Fullerton,CA)分析。

[0206] 用质谱分析比较3D和2D培养的粘附细胞的蛋白概况。如上所述从胎盘生产源自2D和3D培养程序的粘附细胞。简言之,通过在增湿5%CO<sub>2</sub>气氛下于37℃在175cm<sup>2</sup>培养瓶中培养 $0.3$ - $0.75 \times 10^6$ 个细胞4天直至达到60-80%汇合来生产2D培养物。通过在含有2000个载体的生物反应器中接种 $2$ - $10 \times 10^6$ 个细胞/克并培养18天来生产3D培养物。收获后洗涤细胞(X3)以去除所有血清,沉淀并冷冻。根据厂商的方案,从沉淀物分离蛋白质[使用Tri试剂盒(Sigma,Saint Louis,USA),用胰蛋白酶消化并用iTRAQ试剂标记(Applied Biosciences,Foster City,CA)]。简言之,iTRAQ试剂为非多聚体的同量异序标记试剂。用四种同量异序的同位素编码标记中的一种经由其N末端和/或赖氨酸侧链标记每一样品中的肽。混合四个经标记的样品,用质谱法分析肽。肽片段化后,每种标记释放独特的质量报告离子,因此,四种报告离子的比值给出样品中特定肽的相对丰度(信息见:<http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/00113379.pdf>)

[0207] 在Smoler蛋白质组中心(department of Biology,Technion,Haifa,Israel)用LC-MS/MS在QTOF-Premier(Waters,San Francisco,CA)上进行源自胎盘的粘附细胞的2D培

养物对3D培养物的蛋白质组分析,且通过Pep-Miner软件[Beer,I.等,Proteomics,4,950-60(2004)]针对nr数据库的人类部分进行鉴定和分析。被分析的蛋白质有:异质细胞核糖核蛋白H1(Hnrph1, GeneBank登录号NP\_005511)、H2A组蛋白家族(H2AF, GeneBank登录号NP\_034566.1)、真核细胞翻译延伸因子2(EEEF2, GeneBank登录号NP\_031933.1)、网钙结合蛋白3、EF-手钙结合结构域(RCN2, GeneBank登录号NP\_065701)、CD44抗原同种型2前体(GeneBank登录号NP\_001001389)、钙调理蛋白1碱性平滑肌(CNN1, GeneBank登录号NP\_001290)、3磷酸腺苷5磷酸硫酸合酶2同种型a(Papss2, GeneBank登录号NP\_004661)、核糖体蛋白L7a(rpL7a, GeneBank登录号NP\_000963)和醛脱氢酶X(ALDH X, GeneBank登录号P47738)。每一实验进行2次。因为分析的特性,每一蛋白质按照出现在样品中的肽数目来分析(在每一次分析中蛋白质出现2-20次)。

[0208] 用ELISA比较3D和2D培养的粘附细胞中分泌的蛋白质-如上所述生产来自胎盘的源自2D和3D培养操作的粘附细胞,且3D培养持续24天。此后收集条件培养基,在三个独立的实验中,用ELISA(R&D系统,Minneapolis,MN)对Flt-3配体、IL-6、促血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)进行分析。结果标准化为 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml。

[0209] 成骨细胞分化培养基-通过在由添加了10%FCS、100nM地塞米松、0.05mM抗坏血酸2-磷酸盐、10mM B-甘油磷酸盐的DMEM组成的成骨细胞分化培养基中培养细胞3周来评估成骨细胞分化。由Alizzarin Red S染色显示钙化基质,由碱性磷酸酶测定试剂盒(所有试剂来自Sigma-Aldrich, St.Lewis, MO)检测碱性磷酸酶。

[0210] 实验结果

[0211] PluriX™生物反应器系统创造了生理样微环境

[0212] 为了给粘附细胞提供有效的培养条件,用PluriX生物反应器(Pluristem, Haifa, Israel;载体阐明于图1G,在接种前显示于图1B中)人工创造生理样环境(图1A中所述)。如图1C-F所示,骨髓产生的3D-粘附细胞在3D基质上在接种后20天(图1B-C,分别放大 $\times 150$ 和 $\times 250$ )和40天(图1C-D,分别放大 $\times 350$ 和 $\times 500$ )成功培养并扩增。

[0213] 生长在PluriX生物反应器系统中的细胞被显著扩增-不同生产批次的源自胎盘的3D-粘附细胞在PluriX生物反应器系统中生长。接种密度为13,300个细胞/载体(至总量为 $2 \times 10^6$ 个细胞)。接种14天后,细胞密度增加至15倍,达到约200,000个细胞/载体(图2),或150个载体的生物反应器中 $30 \times 10^6$ 个。在不同的实验中,将细胞以 $1.5 \times 10^4$ 个细胞/ml的密度接种到生物反应器中,接种30天后,载体含有超过50倍的细胞数量,即约 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/载体或 $0.5 \times 10^7$ 个细胞/ml。在各种水平生长柱的载体上的细胞密度一致,说明氧和营养素均一传递到细胞。由此证明3D培养系统为高密度间充质细胞培养物的生长和长期维持提供支持条件,所述细胞培养物可以有效生长到足以用于支持移入和成功移植目的的量。

[0214] 3D-粘附细胞显示独特的膜标记特征-为了确定可溶性分子的分泌概况及蛋白质产生(通过模拟骨环境的3D培养操作来实施)的差异,进行了FAC分析。如图3A所示,细胞标记的FACS分析描述的是,3D-粘附细胞表现出与在2D条件中生长的粘附细胞不同的标记表达型式。与3D培养的细胞相比,2D培养的细胞表达显著更高水平的阳性膜标记CD90、CD105、CD73和CD29膜标记。例如,3D培养的细胞显示56%的CD105表达,对比2D培养的细胞为87%。2D和3D二者胎盘培养物的粘附细胞都不表达任何造血膜标记(图3B)。

[0215] 3D-粘附细胞显示独特的可溶性因子概况-造血龛(niche)包括产生丰富细胞因

子、趋化因子和生长因子的支持细胞。为了进一步确定2D和3D培养的粘附细胞之间的差异，通过ELISA得到2D和3D粘附细胞培养物条件培养基中四种主要的造血分泌蛋白的概况。图4A-C显示生长在3D条件的细胞产生含更高水平的F1t-3配体(图4A)、IL-6(图4B)和SCF(图4C)的条件培养基，而在2D培养物的条件培养基中检测到较低水平的IL-6和接近零水平的F1t-3配体和SCF。在两种培养物中促血小板生成素(TPO)产量都很低并相等。

[0216] 3D-粘附细胞在质谱分析中显示独特的蛋白概况-为了进一步确定2D和3D培养的粘附细胞之间的差异，用质谱分析这些细胞的蛋白概况。图4D显示2D和3D培养的粘附细胞表现出明显不同的蛋白质表达概况。如下表1所示，3D培养的细胞显示出更高的H2AF和ALDH X表达水平(分别为超过9和12倍)和更高的EEEEF2、RCN2和CNN1蛋白水平(分别为约3、2.5和2倍)。另外，3D培养的细胞显示约一半的蛋白Hnrph1和CD44抗原同种型2前体表达水平和约三分之一的Papss2和rpL7a表达水平。

[0217] 表1

	蛋白	蛋白水平 (相对于 <i>i</i> TRAQ报告基团)			
		2D培养的粘附细胞		3D培养的粘附细胞	
		<i>Av</i>	<i>SD</i>	<i>Av</i>	<i>SD</i>
[0218]	Hnrph1	1.434493	0.260914	0.684687	0.197928
	H2AF	0.203687	0.288058	1.999877	0.965915
	EEEEF2	0.253409	0.130064	0.799276	0.243066
	RCN2	0.54	0.25	1.34	0.26
	CD44 抗原同种型2前体	1.68	0.19	0.73	0.17
	CNN1	0.77	0.15	1.55	0.17
	Papss2	1.48352	0.314467	0.45627	0.137353
	rpL7a	1.22	0.24	0.43	0.05
	ALDH X	0.15847	0.22411	1.986711	0.212851

[0219] 3D-粘附细胞具有分化为成骨细胞的能力-为了进一步表征3D-粘附细胞，在成骨细胞分化培养基中将细胞培养3周。此后实施钙沉淀。分化的细胞显示产生了钙(图5A-B中的红色所描述)，而对照细胞维持成纤维细胞样表型并表明没有矿化(图5C-D)。这些结果表明源自胎盘的3D-粘附细胞具有体外分化为成骨细胞的能力。

[0220] 实施例2

[0221] 源自胎盘的3D-粘附细胞改善HSC移入的能力评估

[0222] 通过在经亚致死辐射或化疗预处理的免疫缺陷NOD-SCID小鼠中检测人造血细胞(hCD45+)水平，来评估3D-粘附细胞的支持HSC移入。

[0223] 材料和实验方法

[0224] 分离CD34+细胞-在分娩期间于无菌条件下取脐带血样品(Bnei Zion Medical Center, Haifa, Israel)，用Lymphoprep(Axis-Shield PoCAs, Oslo, Norway)密度梯度离心分级分离单核细胞并冷冻保存。洗涤解冻的单核细胞并用抗CD34抗体孵育，用midi MACS(Miltenyl Biotech, Bergish Gladbach, Germany)分离。将来自一个以上样品的细胞合并达到所需的量(50,000-100,000个细胞)。

[0225] 在经辐射小鼠中检测移植的细胞-在无菌开放系统笼中饲养7周龄雄性和雌性NOD-SCID小鼠(NOD-CB17-Prkdescid/J; Harlan/Weizmann Inst., Rehovot Israel)，给予



无菌饮食和高压灭菌的酸性水。亚致死 (350cGy) 辐射小鼠, 此后 (辐射后48小时) 通过静脉注射至尾静脉, 移植50,000-100,000个hCD34+细胞, 加上或不加另外的源自胎盘或脂肪组织的粘附细胞 ( $0.5 \times 10^6$ - $1 \times 10^6$ ) (每组3-7只小鼠)。移植4-6周后, 脱臼处死小鼠, 用FACS缓冲液 (50ml PBS, 5ml FBS, 0.5ml 5%叠氮化钠) 从大腿骨和胫骨两处冲洗收集BM。通过流式细胞术检测小鼠BM中的人细胞, 通过将细胞与抗人CD45-FITC (IQ Products, Groningen, The Netherlands) 孵育, 得到在处理的NOD-SCID小鼠中表达人和鼠CD45造血细胞标记的细胞百分比。明确的人移入最低阈值指定为0.5%。

[0226] 化疗处理的小鼠中移植细胞的检测-如上文对辐射小鼠所述饲养的6.5周龄雄性NOD-SCID小鼠 (NOD.CB 17/JhkiHsd-scid; Harlan, Rehovot Israel) 接受白消安 (25mg/kg-连续2天) 腹膜内注射。第二次注射白消安两天后, 单用CD34+细胞或与从胎盘产生的  $0.5 \times 10^6$  个粘附细胞一起注射小鼠。移植后3.5周, 处死小鼠, 如上文对辐射小鼠所述测定人造血细胞的存在。

[0227] 实验结果

[0228] 3D-粘附细胞改善辐射小鼠中HSC移入-在经辐射NOD-SCID小鼠中共同移植人CD34+造血细胞和源自胎盘或脂肪组织的3D-粘附细胞。在共同移植后4周评估移入效率, 并与单用HSC移植的小鼠比较。如表2所示, 与单用UCB CD34+细胞处理的小鼠比较, 3D-粘附细胞和UCB CD34+细胞共同移植导致显著更高的移入率及更高水平的受者小鼠BM中的人细胞。

[0229] 表2

[0230]

移植的细胞	平均 <i>h-CD45</i>	<i>STDEV</i>
CD34	3.8	7.9
来自胎盘的CD34 + 3D-粘附细胞	5.1	12.2
来自脂肪的CD34 + 3D-粘附细胞	8.7	9.6

[0231] 3D-粘附细胞改善化疗小鼠的HSC移入-将人CD34+造血细胞与源自胎盘的500,000-2D-粘附细胞或3D-粘附细胞共同移植到经化疗预处理的NOD-SCID小鼠中。在共同移植之后3.5周评估移入效率, 并与单用HSC移植的小鼠比较。如表3和图6所示, 与单用UCB CD34+细胞相比, 粘附细胞和UCB CD34+细胞共同移植导致受者小鼠BM中的移入水平更高。此外, 如表3所示, 用在PluriX生物反应器系统中生长的源自胎盘的粘附细胞 (3D-粘附细胞) 共同移植的小鼠, 比在常规静态2D培养条件 (培养瓶) 中生长的来自同样供者的细胞共同移植的小鼠的平均移入水平更高。

[0232] 表3

[0233]

移植的细胞	平均h-CD45	STDEV
CD34	0.9	1.1
CD34+来自胎盘的常规2D培养物	3.5	0.2
CD34+来自胎盘的3D-粘附细胞	6.0	7.9

[0234] 图7A-B中所示的FACS分析结果证明粘附细胞与hHSC (图7B) 共同移植的优势, 以及在HSC移植后粘附细胞改善造血系统恢复的能力。

[0235] 这些结果综合起来表明, 粘附细胞可在HSC移植 (自体或同种异体) 之后作为支持细胞改善造血恢复。3D-粘附细胞在HSC移植之后提高造血干细胞和/或祖细胞移入的能力

可能来自3D-粘附细胞分泌可改善移植细胞的归巢、自我更新和增殖能力的支持HSC的细胞因子的能力,或来自那些细胞重建可移植的HSC归巢和增殖所需的受损造血微环境的能力。

[0236] 实施例3

[0237] 通过2D和3D培养的粘附细胞抑制淋巴细胞应答

[0238] 在MLR分析中发现粘附细胞尤其是3D-粘附细胞抑制人类脐带血单核细胞的免疫反应。

[0239] 材料和实验方法

[0240] 混合淋巴细胞反应(MLR)测定法-通过MLR测定法测定源自2D和3D培养方法的从胎盘产生的粘附细胞的免疫抑制和免疫赦免特性,MLR测定法测量位于HLA基因座的组织相容性,根据在应答细胞(增殖)和刺激细胞(非增殖)的混合培养中不相容淋巴细胞的增殖率来实现。使用人脐带血(CB)单核细胞( $2 \times 10^5$ )作为应答细胞,其通过与等量( $10^5$ )经辐射(3000Rad)的源自人外周血单核细胞(PBMC)、或者与2D或3D培养的由胎盘产生的粘附细胞或粘附细胞和PBMC组合的共同培养来刺激。每一测定重复三次。细胞在96-孔板中的RPMI 1640培养基(含20%FBS在增湿的5%CO<sub>2</sub>气氛下于37℃)中共同培养4天。在培养的最后18小时用1μC <sup>3</sup>H-胸苷脉冲该板。然后经玻璃纤维滤器收集细胞,用闪烁计数器定量胸苷吸收。

[0241] 实验结果

[0242] 图8A显示CB细胞的免疫应答,如当用PBMC刺激时这些细胞的增殖增加所表现,在不受任何理论的束缚下这很可能与响应HLA不相容性的T细胞增殖有关。然而,当与本发明粘附细胞孵育时,这些细胞显示出显著更低的免疫应答水平。此外,当与这些粘附细胞共同孵育时,CB对PBMC的免疫应答基本降低了。因此,以与MSC相似的方式,发现粘附细胞具有潜在的降低供者细胞的T细胞增殖(典型的是GvHD)的能力。尽管2D和3D两种培养物都降低了淋巴细胞免疫应答,但与上文所述的3D-粘附细胞的其它优点一致,3D粘附细胞的免疫抑制更强。

[0243] 实施例4

[0244] 比较PLURIX生产的3D粘附细胞和CELLIGEN生产的粘附细胞

[0245] 为了提供大规模的3D粘附细胞,应用一种在本文中称作Celligen的新生产系统。

[0246] 材料和实验方法

[0247] Plurix™活塞流动生物反应器-如上文实施例1中所述。

[0248] 由Plurix生产3D-粘附细胞(PLX细胞)-如上文实施例1中所述。

[0249] Celligen™活塞流动生物反应器-Celligen™生产粘附细胞(PLX-C细胞)由图8B显示的若干主要步骤组成。该方法起始于从有计划的足月剖腹产收集胎盘。

[0250] 然后从完整胎盘分离粘附细胞,使生长在组织培养瓶(2D)中,收获并作为2D-细胞原种(2DCS)保存在液氮中,解冻适量的2DCS,洗涤并接种至生物反应器中的载体上以进一步扩增为3D-培养物。在生物反应器中生长1-3周后,收获细胞并作为PLX-C冷冻保存在液氮的气相中。

[0251] 人组织的接收

[0252] 所有获得的胎盘均在该医疗机构的赫尔辛基委员会的准许下获自产科病房。因此,所有的胎盘供者签署了知情同意书并进行供者筛选和供者检测(IPC1)。从供者取得胎盘(在剖腹产操作中)后立即将其置于无菌塑料袋中,然后置于有冰袋的Styrofoam盒中。运

送胎盘并立即置于隔离区直到质量控制(QC)和质量保证(QA)放行使用。所有之后的生产步骤均在隔离的洁净室设备中进行直到支原体检测结果的QC批准到达,然后放行细胞用于2D细胞生长。

[0253] 粘附细胞的回收和加工

[0254] 为了开始该过程,在层流通风橱下于无菌条件下将完整的胎盘切碎,以Hank's缓冲液洗涤并于37℃与0.1%胶原酶(1mg胶原酶/ml组织)孵育3小时。加入2D细胞培养基(包含添加了10%FBS、0.25μg/ml两性霉素B和50μg/ml庆大霉素的DMEM的2D-培养基)并将被消化的组织粗略地滤过无菌金属滤网,收集在无菌烧杯中并离心(10分钟,1200RPM,4℃)。然后轻轻抽吸,用添加了抗生素的2D-培养基洗涤悬浮的细胞,接种在80cm<sup>2</sup>培养瓶中并在组织培养培养箱中于补充了5%CO<sub>2</sub>增湿条件下37℃孵育。2-3天后,细胞粘附至培养瓶表面,用PBS将它们洗涤并加入2D-培养基。

[0255] 二维(2D)细胞生长

[0256] 在第一次传代前,将隔离中的10%总培养瓶数的生长培养基样品合并并进行支原体检测(IPC2)。如果发现细胞的支原体(EZ-PCR支原体试剂盒,Biological Industries, Israel)为阴性,将细胞从隔离区放行。继续传代1-2次后,将细胞转移至2D生产洁净室(2DP)中。一旦进入2DP室,细胞继续传代3-5代。第四次传代后取IPC-3样品用于免疫表型检测。在整个过程中,培养物在组织培养培养箱中于5%CO<sub>2</sub>增湿条件下37℃生长于不含抗生素的2D培养基中。总共传代6-8代(9-16次细胞倍增)后,收集细胞并作为2D-细胞原种(2DCS)冷冻保存。

[0257] 通常在10-15天后进行第一次传代。从第2代开始持续至6-8代,通常在3-5天后(1.5-2次倍增)当培养物达到70-80%汇合时将细胞传代。用0.25%胰蛋白酶-EDTA(37℃,4分钟)从培养瓶分离细胞并以 $3 \pm 0.2 \times 10^3$ 个细胞/cm<sup>2</sup>的培养物密度接种。组织培养瓶的大小随着传代进行而增大。培养过程起始于80cm<sup>2</sup>的组织培养瓶,接着在175cm<sup>2</sup>的培养瓶中,然后在500cm<sup>2</sup>的培养瓶中(Triple瓶),最后将细胞接种至Cell Factory 10盘(6320cm<sup>2</sup>)中。

[0258] 在冷冻保存之前,在2DCS生长期结束时,收集生长培养基并制备样品送至用于支原体检测(IPC 4)经认证的GLP实验室。

[0259] 2D-细胞-原种产品的冷冻保存操作

[0260] 对于2DCS冷冻保存,在无菌条件下用0.25%胰蛋白酶-EDTA收集2D-培养的细胞。将细胞离心(1200RPM,10',4℃)、计数并重悬于2D培养基中。

[0261] 对于冷冻,用2D-冷冻混合物(终浓度为10%DMSO、40%FBS和50%2D-培养基)1:1稀释细胞悬液。从一只胎盘生产约 $1.5-2.5 \times 10^9$ 个细胞。将4ml细胞以终浓度 $10 \times 10^6$ /ml保存在5ml冷冻保存聚丙烯管形瓶中。将管形瓶标记并转移至具有可控速率的冰箱中进行逐渐温度降低过程(1℃/min),之后将它们转移以保存在位于冷冻保存室的液氮冰箱的气相中。将这一材料称作2D-细胞原种(2DCS)批次。

[0262] 开始三维(3D)培养操作

[0263] 为了开始3D培养,在2DP室中从2DCS解冻适量( $150 \pm 30 \times 10^6$ )的细胞并用3D培养基(含10%FBS和20mM HEPES的DMEM)洗涤以在接种到预先准备的生物反应器系统之前去除DMSO。吸出各2DCS管形瓶的内容物并用预温的(37℃)3D培养基1:9稀释。将细胞离心(1200RPM,10',4℃)并再次重悬于250ml无菌瓶中的50-100ml预温的(37℃)3D培养基中。取

样并用Trypan Blue染液计数细胞以测定细胞数量和生存力。在层流通风橱中可将细胞悬液转移至0.5L的接种瓶中。通过重力作用经无菌管道将细胞悬液从接种瓶转移到生物反应器中。

[0264] Celligen生物反应器 (PLX-C) 中3D粘附细胞的生产

[0265] 生物反应器描述

[0266] 使用图8C描绘的自动CelliGen**Plus**®或BIOFLO 310生物反应器系统 [ (New Brunswick Scientific (NBS) ] 进行3D生长期。该生物反应器系统用于培养细胞培养物, 其中的条件适于高细胞浓度。使用灌注模式的生物反应器实施培养过程。实验室规模的生物反应器由两个主要的系统构成-控制系统和生物反应器自身(罐和附件)。该过程的参数由控制台监测和控制, 该控制台包括探针、发动机和泵的接插件, 用于溶氧(DO)、pH、灌注和振荡(有发动机)的控制回路, 气体控制系统、水循环和用于温度控制的加热系统以及操作界面。受控的过程参数(例如温度、pH、DO等)可显示在操作界面上并由指定的控制器监测。

[0267] 生物反应器中细胞培养物生长操作

[0268] 如上文部分提到的, 从冷冻保存的2DCS解冻 $150 \pm 30 \times 10^6$ 个细胞, 洗涤并接种至无菌生物反应器中。该生物反应器包含30-50gr由聚酯和聚丙烯制成的载体(FibraCel® disks, NBS)和 $1.5 \pm 0.1$ L 3D培养基。将生物反应器中的生长培养基保持在以下条件:  $37^\circ\text{C}$ 、70%溶氧(DO)和pH 7.3。根据控制系统所测定供给经过滤的气体(空气、 $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2$ 和 $\text{O}_2$ )以保持DO值为70%且pH值为7.3。对于起始的24小时, 以50转每分(RPM)振荡培养基并在第2天增加到200RPM。在开始的2-3天, 使细胞以批模式生长。当培养基的葡萄糖浓度减少至低于550mg/升时开始灌注。使用无菌硅酮管道将培养基从给料容器泵到生物反应器中。在层流下使用无菌接头进行所有的管道连接。每天调节灌注以保持葡萄糖浓度恒定为约 $550 \pm 50$ mg\升。每1-2天取样生长培养基用于葡萄糖、乳酸盐、谷氨酰胺、谷氨酸和铵浓度测定(BioProfile400分析仪, Nova Biomedical)。细胞培养物的葡萄糖消耗速率和乳酸盐形成速率使得可以测量细胞生长速率。这些参数用于根据累积的实验数据确定收获时间。

[0269] 从生物反应器收获3D生长的PLX-X细胞

[0270] 在生长期结束时(4-10天)开始细胞收获过程。收集两个生长培养基的样品。制备一个样品并送至经认证的GLP实验室根据USP和Eu标准进行支原体检测, 将另一个样品转移到可控速度的冰箱中进行逐渐温度降低过程( $1^\circ\text{C}/\text{分钟}$ ), 之后将它们转移以保存在位于冷冻保存室的液氮冰箱的气相中, 以备需要重复支原体检测。这些培养基样品被认为是终产品支原体检测的一部分且结果被认为是产品放行标准的一部分。

[0271] 在3DP室中如下将3D生长的培养物收获到Class-100层流区中:

[0272] 利用重力作用经管道将生物反应器罐排空至废物容器中。通过移除顶板打开罐, 使用无菌镊子将载体从篮无菌转移到上部篮网(见图8C)。然后关闭生物反应器罐并再填入1.5L预温的PBS( $37^\circ\text{C}$ )。将振荡速度增加至150RPM并持续2分钟。通过压力或重力经管道排出PBS至废物瓶中。洗涤操作重复两次。

[0273] 为了将细胞从载体释放, 向生物反应器罐中加入1.5L预温至 $37^\circ\text{C}$ 的胰蛋白酶EDTA(0.25%胰蛋白酶, EDTA 1mM)并将载体于 $37^\circ\text{C}$ 、150RPM振荡5分钟。将细胞悬液收集至包含250ml FBS的5L无菌容器中。将细胞悬液分至4个500ml的无菌离心管中并取出支原体检测样品。将盖住的离心管经3DP active pass-through转移至10,000级灌装间(FR1), 在那里

将细胞无菌灌装并冷冻保存为PLX-C。

[0274] 细胞周期分析-用70%EtOH 0.1N将通过Celligen获得的PLX-C细胞和通过Plurix获得的PLX细胞固定,离心并重悬于包含2 $\mu$ g/ml PI (Sigma)、0.2mg/ml Rnase A (Sigma) 和0.1% (v/v) Triton (Sigma) 的碘化丙锭 (PI) 溶液中并持续30分钟。通过FACS分析细胞周期。

[0275] 基因表达阵列(微阵列)-粘附细胞获自人足月胎盘并通过Plurix或Celligen扩增。从各扩增方法获得三个不同批次的细胞用于进一步检验。

[0276] 从细胞提取RNA (Qiagen-Rneasy微量试剂盒) 并应用至Affymetrix完整基因组表达阵列。芯片使用 **GeneChip®** Human Exon 1.0ST阵列 (Affymetrix, Santa Clara, California, USA)。

[0277] 膜标记的FACS分析-用如之前描述的单克隆抗体染色细胞。简言之,将400,000-600,000个细胞悬浮于5ml试管中的0.1ml流式细胞测定仪缓冲液中并于室温 (RT) 下于暗处与以下各单克隆抗体 (Mab) 温育15分钟: FITC-缀合的抗人CD29 Mab (eBioscience)、PE缀合的抗人CD73 Mab (Becton Dickinson)、PE缀合的抗人CD105 Mab (eBioscience)、PE缀合的抗人CD90 Mab (Becton Dickinson)、FITC-缀合的抗人CD45 Mab (IQProducts)、PE-缀合的抗人CD19 Mab (IQProducts)、PE缀合的抗人CD14 Mab (IQProducts)、FITC缀合的抗人HLA-DR Mab (IQProduct)、PE缀合的抗人CD34 Mab (IQProducts)、FITC缀合的抗人CD31 Mab (eBioscience)、FITC缀合的抗人KDR Mab (R&D systems)、抗人成纤维细胞标记 (D7-FIB) Mab (ACRIS)、FITC-缀合的抗人CD80 Mab (BD)、FITC-缀合的抗人CD86 Mab (BD)、FITC-缀合的抗人CD40 Mab (BD)、FITC-缀合的抗人HLA-ABC Mab (BD)、FITC缀合的同种型IgG1 (IQ Products)、PE缀合的同种型IgG1 (IQ Products)。

[0278] 用流式细胞计数仪缓冲液将细胞洗涤两遍,重悬于500 $\mu$ l流式细胞计数仪缓冲液中并采用FC-500流式细胞计数仪 (Beckman Coulter) 分析。用相关的同种型荧光分子制备阴性对照。

[0279] 混合淋巴细胞反应 (MLR)

[0280] 用等量的经辐射 (3000Rad) 的源自PB的MNCs (来自供者B) 刺激 $2 \times 10^5$ 个源自外周血 (PB) 的MNCs (来自供者A)。向培养物中加入逐渐增加量的PLX-C。将各组的三个重复接种于96孔板中。将细胞培养在包含20%FBS的RPMI 1640培养基中。在5天培养的最后18小时用1 $\mu$ C  $^3$ H-胸苷脉冲该板。然后经玻璃纤维滤器收集细胞,用闪烁计数器定量胸苷吸收。

[0281] 对于CFSE染色,将PB-MNC细胞染色用于CFSE (分子探针) 用于培养前的增殖测量。5天后收集细胞并通过流式细胞计数仪检测CFSE染色的密度。

[0282] ELISA

[0283] 如之前所述进行ELISA。简言之,用5 $\mu$ g/ml ConA (Sigma)、0.5 $\mu$ g/ml LPS (SIGMA) 或10 $\mu$ g/ml PHA (SIGMA) 在PLX-C存在下在增湿的5%CO<sub>2</sub>气氛下于37℃刺激MNC (分离自外周血)。收集上清并用ELISA试剂盒进行IFN  $\gamma$  (DIACLONE)、TNF $\alpha$  (DIACLONE) 和IL-10 (DIACLONE) 的细胞因子分析。

[0284] 实验结果

[0285] 与Plurix相比,用Celligen生产中的变化引起若干主要的差异 (总结于下表4)。

[0286] 表4:Plurix系统和Celligen系统的比较

[0287]

参数	根据实施例 1 的细胞生长	本发明教导	改进
----	---------------	-------	----

[0288]

参数	根据实施例 1 的细胞生长	本发明教导	改进
工作体积(ml)	280	1500	将该方法的规模扩大。本教导的生产水平更高(2-8 次群体倍增)
载体重量(gr)	1.4	30	将该方法的规模扩大
床结构	圆锥形, 50 ml 柱	圆筒形填充床	本教导-培养基和营养物质的流动性更好。 实施例 1 的教导- 由于圆锥形结构的出口狭窄导致流动性不足。 培养基流动均匀性更好。实施例 1 教导中的连通。
接种时的细胞浓度(细胞/gr 载体)	$3 \times 10^6$ 个细胞/gr 载体	$5 \times 10^6$ 个细胞/gr 载体	本教导中细胞和细胞之间的相互作用更好
接种时的细胞浓度(细胞/ml)	$0.015 \times 10^6$ 个细胞/ml	$0.1 \times 10^6$ 个细胞/ml	本教导中细胞和细胞之间的相互作用更好
接种操作	在低培养基体积中接种, 24 小时后加入培养基至最终工作体积	在最终工作体积中边振荡边接种	实施例 1 的教导-细胞培养物在载体床内部非均质分布。在运转的第一个 24 小时内培养基体积不足。导致工作条件不适当(酸性环境)

[0289]

参数	根据实施例 1 的细胞生长	本发明教导	改进
生产期持续时间	14-21 天	4-10 天	本教导中产品质量更好、收获过程有效、产率更高、成本更低
操作模式	重复分批-每周更换两次培养基	灌注模式-根据葡萄糖浓度调节流速（当葡萄糖浓度为 550 ± 50 mg/L 时改变培养基）	本教导-在整个运转中就培养基组分而言发生中度的条件变化。持续移除由细胞产生的毒性物质。在分批模式中-主要营养成分浓度较低（限制因素）。细胞碎片更少
收获操作	收获在 50 ml 管中 胰蛋白酶消化 3 个循环	在生物反应器中收获 胰蛋白酶消化 1 个循环	本教导-更有效的方法。在封闭系统中进行收获。1 次胰蛋白酶消化循环-细胞质量更好
振荡	用蠕动泵进行库容器和柱子之间的培养基循环	细胞提升式叶轮	本教导-培养基流过填充床-向培养物更好地供给营养物质和氧气。培养基的均匀性。改善了其他控制回路（温度、DO、pH）
温度控制	生产在培养箱内进行。间接温度控制（培养箱室的）。经空气界面传送热量	在线直接控制。经水夹套传送热量。	本教导-更准确地测量培养物的温度。反应快。达到设定点的时间短。

[0290]

参数	根据实施例 1 的细胞生长	本发明教导	改进
温度监测	手动监测。间接的水温监测。	在线直接监测。	本教导-更好地监测和控制该过程。对故障反应迅速。
DO 监测	无	在线监测	本教导-更好地监测和控制该过程。对故障反应迅速。
DO 控制	无。仅引入空气	用空气、O <sub>2</sub> 和 N <sub>2</sub> 。 在线直接控制特定的设定点	本教导-更好的控制 DO 水平。更好地维持特定的工作条件。
pH 监测和控制	仅视觉监测(酚红作为培养基的一部分)	在线控制和监测	本教导-更好地控制 pH 水平。 更好地维持特定的工作条件。
通气	仅鼓泡	覆盖 (Overlay) (鼓泡作为一种选择)	实施例 1 的教导-通过鼓泡通气产生可损坏细胞的泡沫。

[0291] 生产方法的变化导致所得3D粘附细胞的特性改变。这些差异总结于下文。

[0292] 与Celligen生产的PLX-C相比分析Plurix生产的PLX的细胞周期-比较通过Celligen获得的PLX-C细胞与通过Plurix获得的PLX细胞以检测细胞在细胞周期不同期之间的分布。如图9A-B明确显示,由Celligen扩增的PLX-C细胞显示出典型的增殖概况(细胞周期不同期的细胞分布)。具体而言,28%的细胞在S和G2/M期(图9A)。这些结果表明在增殖过程中将细胞收获且Celligen生物反应器条件支持细胞生长。

[0293] Plurix和Celligen所获细胞之间的微阵列比较-基因表达阵列使得可以同时监测由Plurix (PLX) 或由Celligen (PLX-C) 扩增的衍生自人足月胎盘的粘附细胞的全基因组表达概况。这些结果使可以评估这些不同的生长方法获得细胞之间表型差异的分子机制(见下表5)。

[0294] 表5:比较Plurix和Celligen细胞中的基因表达



基因	Celligen	p-值(处理)
	对Plurix (倍数变化)	
含三十四肽重复的干扰素诱导蛋白	17.52	0.0401812
醛脱氢酶1家族, 成员A1	16.76	0.00145807
白细胞衍生精氨酸氨肽酶	13.99	3.88E-06
角蛋白27假基因27	12.25	0.000224998
类似角蛋白, I型细胞骨架18 (细胞角蛋白	11.83	0.000304949
G 蛋白偶联受体, 家族C, 组5, 成员A	10.35	3.39E-05
整联蛋白, $\alpha 6$	9.84	0.0411667
G蛋白偶联受体126	8.73	0.00197635
凝血因子III (促凝血酶原激酶, 组织因子)	7.36	0.012192
Rho GDP 解离抑制因子(GDI) $\beta$	7.36	0.00200066
信号肽, CUB域, EGF-样3	7.20	0.0255115
[0295] 含三十四肽重复的干扰素诱导蛋白	7.09	0.0139777
dickkopf同系物1 (非洲爪蟾)	7.06	3.06E-07
NAD(P)H 脱氢酶, 醌1	6.63	0.000282423
角蛋白18	6.46	0.000514523
阿片样物质生长因子受体-样 1	5.96	0.00114551
mal, T-细胞分化蛋白-样	5.95	0.00664216
神经丝, 介质多肽150kDa	5.86	0.0190611
含DEP 域1	5.82	0.000370513
组织蛋白酶C	5.72	0.00532262
WAS	5.47	0.00178153
丝氨酸蛋白酶抑制剂肽酶抑制剂, 进化枝 B (卵白蛋白), 成员	5.44	0.0190218
溶质载体家族 7, (阳离子氨基酸转运蛋白	5.33	0.00688017
含三十四肽重复的干扰素诱导蛋白	5.18	0.00357376

	NUF2, NDC80动粒复合体成分, 同系物 (S.cere	5.05	0.00276524
	SHC SH2-域结合蛋白1	4.95	0.00430878
	硫氧还蛋白还原酶1	4.86	0.000197486
	肺癌转移关联蛋白	4.85	0.00148024
	Rho GTP酶激活蛋白29	4.85	0.0466211
	细胞分裂周期20同系物(酿酒酵母)	4.80	0.00514206
	序列相似家族111, 成员B	4.63	0.000125819
	PDZ 结合激酶	4.54	0.00784983
	确定黏结1同系物 2(酿酒酵母)	4.53	0.000773033
	鸟苷酸结合蛋白 4	4.47	0.000215944
	脂肪酶 A, 溶酶体酸, 胆固醇酯酶 (Wolman病	4.42	0.0167385
	驱动蛋白家族成员20A	4.39	0.00582352
	KIAA0101	4.28	0.0105909
	周期蛋白依赖激酶抑制因子3 (CDK2-关联双	4.25	0.000732492
	胸苷酸合成酶	4.23	0.00685584
[0296]	染色体13 开放阅读框 3	4.18	0.000548296
	极光激酶A	4.16	0.00632571
	nei 核酸内切酶 VIII-样 3(大肠杆菌)	4.14	0.00115606
	中心体蛋白 55kDa	4.13	0.0021952
	氧化低密度脂蛋白 (凝集素-样) 受体1	4.11	0.0205198
	无小齿同系物 (果蝇)	4.05	0.00141153
	胞环蛋白, 肌动蛋白结合蛋白	4.01	0.010923
	核糖核酸还原酶M2多肽	3.98	0.00834059
	锚蛋白重复域1(心肌)	3.93	0.00911953
	转录因子19(SC1)	3.89	0.00109627
	角蛋白18	3.89	0.000112551
	非-SMC凝聚蛋白 I 复合体, 亚基 G	3.88	0.00537097
	周期蛋白E2	3.87	0.000203389
	胰蛋白酶原C	3.86	0.00416276
	小核仁RNA, C	3.81	0.0334484
	紧密连接蛋白 2(闭锁小带2)	3.81	0.00012562

	驱动蛋白家族成员18A	3.78	0.00134108
	驱动蛋白家族成员2C	3.77	0.0059888
	shugoshin-样1 (裂殖酵母)	3.76	0.00101318
	polo-样激酶1 (果蝇)	3.75	0.0140309
	胸苷激酶1, 可溶	3.73	0.00124134
	转录因子19 (SC1)	3.73	0.00124327
	转录因子19 (SC1)	3.73	0.00124327
	claspin同系物 (非洲爪蟾)	3.71	0.00683624
	GINS复合体亚基1 (Psf1同系物)	3.69	0.00104515
	微粒体谷胱甘肽S-转移酶1	3.67	0.041701
	芳乙酰胺脱乙酰酶-样1	3.67	0.000902645
	SPC25, NDC80 动粒复合体成分,同系物 (S.ce	3.65	0.00568662
	整联蛋白, $\alpha$ 4 (抗原CD49D, VLA-4受体 $\alpha$ 4亚基	3.62	0.0158411
	连环蛋白(钙粘着蛋白关联蛋白), $\alpha$ -样1	3.57	7.46E-05
	discs, 大同系物 7 (果蝇)	3.56	0.0317074
[0297]	v-myb成髓细胞血症病毒癌基因同系物(鸟类)-样	3.55	0.0043878
	丝甘蛋白聚糖	3.54	0.0443487
	着丝粒蛋白 N	3.53	0.000540143
	周期蛋白A2	3.53	0.00965934
	热休克 22kDa蛋白8	3.52	0.0219583
	sema 域, 免疫球蛋白域(Ig), 短碱性域	3.49	0.008548
	Rho GTP酶激活蛋白11A	3.49	0.00834174
	Fanconi贫血, 互补组 I	3.43	0.00464532
	苯并咪唑1同系物 (酵母) 解除BUB1出芽抑制	3.42	0.0108258
	卵巢特异酸性蛋白	3.42	0.00334641
	胆碱能受体, 毒蕈碱2	3.41	0.0320078
	细胞分裂周期2, G1至S和G2至M	3.41	0.0017111
	胞质分裂蛋白调控因子 1	3.39	0.0325664
	微染色体维持复合体成分5	3.38	0.00475504
	精子关联抗原 5	3.37	0.00906321
	母系胚亮氨酸拉链激酶	3.34	0.00908391

	小核仁RNA, C	3.33	0.0298703
	肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A (肝脏)	3.33	0.00170894
	类似泛素-缀合酶E2S (泛素	3.33	0.000415822
	驱动蛋白家族成员11	3.33	0.00915145
	NIMA(永离有丝分裂基因a)相关激酶7	3.33	0.00159114
	含血小板反应蛋白1型基序的ADAM 金属肽酶,	3.32	0.0102751
	转化, 酸性含卷曲螺旋蛋白 3	3.31	0.0014577
	周期蛋白B1	3.29	0.0103092
	MAD2有丝分裂停滞缺陷样1 (酵母)	3.28	0.00488102
	二氢叶酸还原酶	3.28	0.00178879
	含NIPA-样域3	3.27	0.00164708
	细胞分裂周期关联2	3.26	0.0122226
	载脂蛋白B mRNA编辑酶, 催化多肽	3.26	0.00308692
	周期蛋白B2	3.25	0.016544
	含核酸内切酶域1	3.24	0.000429245
[0298]	二氢叶酸还原酶假基因	3.23	0.00141306
	ATPase, Na <sup>+</sup>	3.23	0.000381464
	复制因子C (激活因子1) 3, 38kDa	3.23	0.00109668
	WD 重复域76	3.22	0.0023531
	血小板白细胞C激酶底物2	3.17	0.0304429
	Rac GTP酶激活蛋白1	3.17	0.00381613
	PHD 指蛋白19	3.17	0.000177604
	淋巴细胞白血病缺失, 2	3.15	0.0109528
	着丝粒蛋白I	3.15	0.0106816
	BRCA1 关联环域 1	3.14	0.000540414
	G-蛋白信号传导调控因子 4	3.13	0.00781061
	STAM结合蛋白-样1	3.11	0.0181743
	硫氧还蛋白 1 同系物(酿酒酵母)	3.10	5.14E-05
	染色体15开放阅读框23	3.08	0.000147331
	TTK 蛋白激酶	3.08	0.0112171
	非-SMC 凝聚蛋白 II 复合体, 亚基G2	3.08	0.0130322

	绒毛蛋白2 (埃兹蛋白 (ezrin))	3.07	0.0131934
	stomatin	3.06	0.00387095
	含蛋白酪氨酸磷酸酶-样A 域	3.06	0.0419644
	丝氨酸蛋白酶抑制剂肽酶抑制剂, 进化枝 B (卵白蛋白), 成员	3.05	0.0030439
	驱动蛋白家族成员4A	3.05	0.0114203
	预测蛋白 DKFZp762E1312	3.05	0.00726778
	泛素-缀合酶 E2S	3.04	0.00118205
	羟基类固醇脱氢酶样 2	3.03	3.71E-05
	ATP酶家族, 含AAA 域2	3.01	0.00415258
	TPX2, 微管关联, 同系物 (非洲爪蟾)	3.00	0.0253137
	组蛋白群 1, H4d	3.00	0.030183
	驱动蛋白家族成员23	2.99	0.00790585
	热休克70kDa蛋白2	2.99	0.0215102
	起点识别复合体, 亚基1样 (酵母)	2.99	0.00207753
[0299]	二氢叶酸还原酶	2.98	0.00307793
	透明质酸介导的细胞游走受体(RHAMM)	2.97	0.00467816
	3'-磷酸腺苷5'-磷酸硫酸合酶2	2.97	1.43E-05
	甘油-3-磷酸脱氢酶2 (线粒体)	2.95	0.00211969
	核仁和纺锤体关联蛋白1	2.95	0.00520875
	透明同系物 3 (果蝇)	2.95	0.00107709
	驱动蛋白家族成员14	2.94	0.00947901
	组蛋白群 1, H1b	2.93	0.0470898
	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白), $\alpha$ inhi	2.92	0.00184597
	微染色体维持复合体成分8	2.92	0.000841489
	癌易感候选基因 5	2.92	0.0330594
	白三烯B4 12-羟基脱氢酶	2.92	0.000685452
	谷胺酸半胱氨酸连接酶, 修饰亚基	2.91	0.00378868
	叉头框M1	2.91	0.0203154
	脂肪分化关联蛋白	2.90	0.000331751
	含膜结合O-酰基转移酶域1	2.90	0.01185

	泛素-缀合酶E2T (推定)	2.90	0.00741886
	细胞分裂周期关联3	2.89	0.006289
	整联蛋白, $\alpha 3$ (抗原 CD49C, VLA-3受体 $\alpha 3$ 亚基	2.88	0.00574148
	凝血因子XIII, B多肽	2.88	0.0294465
	RAD51同系物(RecA同系物,大肠杆菌)(酿酒酵母)	2.87	0.000854739
	ATP-结合盒, 亚家族C (CFTR	2.87	0.00382491
	序列相似家族29, 成员A	2.85	0.00111165
	含SH2域4A	2.84	0.0323646
	膜蛋白, 棕榈酰化1, 55kDa	2.84	0.000396285
	CDC28 蛋白激酶调节亚基1B	2.84	0.0107391
	PSMC3相互作用蛋白	2.84	0.00766442
	弹性蛋白微原纤维界面因子2	2.84	0.0192072
	拓扑异构酶(DNA) II $\alpha$ 170kDa	2.83	0.0321109
	跨膜蛋白106C	2.82	0.000214223
	组蛋白群 1, H3b	2.80	0.0304598
[0300]	染色体 18开放阅读框24	2.80	0.00347442
	表皮生长因子受体途径底物8	2.79	0.0194949
	高移动组核小体结合域 2	2.78	0.0030536
	SCL	2.78	0.00390288
	百域 ( hecto domain ) 和RLD 4	2.78	0.00679184
	ASF1 抗沉默功能1同系物 B (酿酒酵母)	2.77	0.00543408
	甲状腺素受体相互作用因子13	2.76	0.0118319
	细胞分裂周期关联8	2.75	0.00619878
	驱动蛋白家族成员C1	2.74	0.00821937
	高移动组核小体结合域2	2.73	0.00384071
	鸟氨酸脱羧酶1	2.73	0.00144868
	v-myb成髓细胞血症病毒癌基因同系物(鸟类)-样2	2.71	0.00989416
	KIT 配体	2.70	0.00641955
	双特异性酪氨酸(Y)磷酸化调控ki	2.70	0.0234606
	内鞭毛运输80同系物(衣滴虫)	2.70	0.0247286
	跨膜蛋白48	2.69	0.00458248

	EBNA1结合蛋白2	2.69	0.00296292
	ZW10相互作用物	2.69	1.88E-05
	核酸外切酶1	2.68	0.00739393
	转酮酶(Wernicke-Korsakoff综合征)	2.68	1.92E-05
	促生长素抑制蛋白受体 1	2.68	0.0144901
	异柠檬酸脱氢酶3 (NAD+) $\alpha$	2.67	0.00297129
	细胞骨架关联蛋白2	2.67	0.0030499
	微染色体维持复合体成分4	2.67	0.00342054
	DNA 结合抑制物1, 显性负螺旋环hel	2.66	0.036485
	CDC28 蛋白激酶调控亚基 1B	2.66	0.0145263
	角蛋白18	2.66	8.40E-05
	CD97 分子	2.66	0.00994045
	染色体 6开放阅读框173	2.64	0.00222408
	含BTB (POZ) 域3	2.62	0.0166824
	耳聋, 常染色体显性5	2.62	0.00235481
[0301]	KIAA0286蛋白	2.62	0.00130563
	Fanconi贫血, 互补组 D2	2.61	0.0281405
	polo-样激酶 4 (果蝇)	2.60	0.00209633
	核糖核酸还原酶 M1 多肽	2.60	0.000170076
	苹果酸酶1, NADP(+)-依赖, 细胞溶质	2.59	0.0435444
	非-SMC凝聚蛋白I 复合体, 亚基H	2.59	0.0216752
	S100 钙结合蛋白A3	2.58	0.0324073
	泛素-缀合酶E2L 3	2.57	0.00343347
	苯并咪唑1同系物 $\beta$ 解除BUB1出芽抑制	2.56	0.0166047
	甘油激酶	2.55	2.66E-05
	TAF9B RNA聚合酶II, TATA框结合蛋白(TBP)-as	2.54	0.0170365
	TAF9B RNA聚合酶II, TATA框结合蛋白(TBP)-as	2.54	0.0170365
	组蛋白群1, H2bg	2.52	0.000180822
	高移动组框 2	2.52	0.0196872
	NIMA (永离有丝分裂基因a)相关激酶2	2.50	0.00289469
	富含脯氨酸11	2.50	0.0357125

	myopalladin	2.49	0.0255088
	含brix域 1	2.49	0.00471977
	细胞分裂周期关联5	2.49	0.01021
	岩藻糖苷酶, $\alpha$ -L-2, 血浆	2.49	0.00540929
	周期蛋白依赖性激酶2	2.49	0.00250724
	核纤层蛋白B 受体	2.49	0.000151784
	次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1 (Lesch-Nyhan 综合征	2.49	0.000634057
	含三联基元25	2.47	0.0456344
	蛋白酶体(蛋白酶体, macropain)亚基, $\beta$ 型, 9 (lar	2.46	0.0202595
	蛋白酶体(蛋白酶体, macropain) 亚基, $\beta$ 型, 9 (lar	2.46	0.0202595
	蛋白酶体(蛋白酶体, macropain) 亚基, $\beta$ 型, 9 (lar	2.46	0.0202595
	鞘磷脂合酶2	2.46	0.0020701
	跨膜蛋白62	2.45	0.00761064
	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	2.44	0.00278311
	PHD 指蛋白 1	2.44	0.010191
[0302]	成视网膜细胞瘤-样1 (p107)	2.44	0.00319946
	KIAA1524	2.43	0.0380688
	ST6 ( $\alpha$ -N-乙酰基-神经胺基-2,3- $\beta$ -半乳糖基-1,	2.43	0.00830766
	丝切蛋白2 (肌肉)	2.43	0.0459235
	预测蛋白 LOC201725	2.42	0.000313319
	细胞分裂周期25同系物 A (裂殖酵母)	2.42	0.000341692
	乳腺癌 1, 早发	2.41	0.0180553
	转醛酶1	2.41	0.00199537
	mRNA周转4同系物 (酿酒酵母)	2.41	0.00373104
	葡糖胺(N-乙酰) 转移酶1, 核心2 ( $\beta$ -1,6-N-	2.41	0.0197148
	富含半胱氨酸跨膜BMP调控物1 (索蛋白样)	2.41	0.0267286
	组织因子途径抑制因子(脂蛋白关联	2.40	0.0356227
	染色体 16开放阅读框59	2.40	0.00185191
	糖原蛋白1	2.39	0.0224317
	跨膜蛋白154	2.39	0.0045589
	小管间质性肾炎抗原样 1	2.39	0.00510812



	CTP 合酶	2.38	8.80E-05
	苯丙氨酰-tRNA合成酶, $\beta$ -亚基	2.38	0.000245973
	亭蛋白, DNA 复制抑制因子	2.38	0.00167629
	核纤层蛋白B1	2.37	0.0477748
	SPC24, NDC80 动粒复合体成分,同系物(S.cc	2.36	0.00287227
	谷胱甘肽还原酶	2.36	0.00353875
	核糖体蛋白L22-样1	2.36	0.00335381
	富马酰乙酰乙酸水解酶富马酰乙酰乙酸酶)	2.36	3.88E-05
	小核仁RNA, C	2.35	0.0188991
	序列相似家族64, 成员A	2.35	0.0019785
	上皮细胞转化序列2 癌基因	2.35	0.000571152
	聚合酶(DNA 引导), $\epsilon$ 2 (p59 亚基)	2.34	0.00479612
	甘油激酶	2.34	3.37E-06
	谷胱甘肽S-转移酶M2 (肌肉)	2.33	0.0402076
	延伸因子, RNA聚合酶II, 2	2.33	0.0130017
[0303]	硫氧还蛋白	2.33	0.009636
	聚合酶(DNA引导), $\alpha$ 2 (70kD亚基)	2.32	0.0033903
	乳腺癌2, 早发	2.32	0.00586847
	CDC45细胞分裂周期45-样(酿酒酵母)	2.32	0.00735977
	H2A 组蛋白家族,成员Z	2.32	0.0129697
	转运蛋白 1, ATP-结合盒, 亚家族B (MDR	2.31	0.0164234
	转运蛋白 1, ATP-结合盒, 亚家族B (MDR	2.31	0.0164234
	转运蛋白 1, ATP-结合盒, 亚家族B (MDR	2.31	0.0164234
	核仁复合体关联3同系物 (酿酒酵母)	2.30	0.000373346
	ATPase, Ca <sup>++</sup> 转运, 质膜 4	2.30	0.023011
	微染色体维持复合体成分7	2.30	0.0457691
	TIMELESS 相互作用蛋白	2.29	0.00771062
	von Hippel-Lindau 相互作用蛋白 1	2.28	0.00329061
	Ras相关C3肉毒杆菌毒素底物2 (rho家族, sma	2.28	0.0292466
	胸腺生成素	2.28	0.0223176
	肽酰脯氨酰异构酶F (亲环蛋白F)	2.28	0.00093846

	活化白细胞粘附分子	2.27	0.00242163
	多梳基环指 5	2.27	0.000294142
	Ran GTP酶激活蛋白 1	2.27	9.68E-05
	复制因子C (活化因子1) 4, 37kDa	2.26	0.00164152
	微管蛋白, $\beta$ 2C	2.26	0.000346744
	微染色体维持复合体成分10	2.26	0.0037925
	H2B组蛋白家族, 成员 S	2.25	0.000885505
	$\gamma$ -谷氨酰水解酶(缀合酶, 叶酸多聚 $\gamma$ 谷氨酰	2.25	0.0195219
	转录终止因子, RNA 聚合酶 II	2.25	0.000393489
	聚合酶(DNA引导), $\delta$ 2, 调控亚基50k	2.25	0.0123823
	转运蛋白 1, ATP-结合盒, 亚家族B (MDR	2.25	0.00859077
	转运蛋白 1, ATP-结合盒, 亚家族B (MDR	2.25	0.00859077
	转运蛋白 1, ATP-结合盒, 亚家族B (MDR	2.25	0.00859077
	组蛋白群 1, H2bf	2.25	0.0124279
	真核翻译起始因子1A, X-连锁	2.24	0.00330183
[0304]	磷酸葡萄糖变位酶2	2.24	0.00818204
	过氧化物酶体D3,D2-烯酰基-辅酶A异构酶	2.24	0.00148722
	含三十四肽重复的干扰素诱导蛋白	2.24	0.0177928
	G-2 和S-期表达 1	2.23	0.0241887
	微染色体维持复合体成分2	2.23	0.0021347
	序列相似家族72, 成员A	2.23	0.00143248
	RMI1, RecQ介导的基因组不稳定1, 同系物(酿酒酵母	2.23	0.00294705
	FLJ20105 蛋白	2.23	0.0127979
	多重凝血因子缺陷2	2.22	0.0116892
	植物神经酰胺酶, 碱性	2.22	0.0157729
	含卷曲螺旋域68	2.22	0.00227586
	胞质分裂作用因子(dedicator)11	2.21	0.00697577
	血小板衍生生长因子 $\alpha$ 多肽	2.21	0.00176418
	N-酰基鞘氨醇酰胺水解酶(非溶酶体神经酰胺酶	2.20	0.00728536
	S-期激酶关联蛋白2 (p45)	2.20	0.00230153
	聚合酶 (RNA) III (DNA 引导) 多肽 G (32kD)	2.20	0.0298794

	ADP-核糖基化因子-样 6相互作用蛋白 1	2.20	0.00139745
	组蛋白群 1, H2bh	2.19	0.0377748
	起点识别复合体, 亚基5-样 (酵母)	2.19	0.049697
	CDC28 蛋白激酶调控亚基 2	2.19	0.0128024
	组蛋白群 1, H4c	2.19	0.0112695
	预测蛋白 LOC729012	2.19	0.000446087
	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 框多肽39	2.19	0.000340561
	染色质装配因子1, 亚基B (p60)	2.18	0.0119687
	MLF1相互作用蛋白	2.18	0.0177203
	微管关联丝氨酸	2.18	0.00536974
	MHC类I多肽关联序列B	2.18	0.0165406
	shugoshin-样2 (裂殖酵母)	2.18	0.000852557
	COP9组成型光致形态发生同系物亚基6 (Arab	2.18	0.000793512
	亚甲基四氢叶酸脱氢酶(NADP+ 依赖)	2.18	0.00119726
	染色体 6开放阅读框167	2.18	0.0011095
[0305]	垂体肿瘤转化1	2.17	0.0485166
	核糖核酸酶H2, 亚基A	2.17	0.00669936
	中国ham X射线修复补充缺陷修复	2.16	0.0369865
	膜蛋白, 棕榈酰化5 (MAGUK p55亚家族成员	2.16	0.00211873
	核周蛋白 $\alpha$ 2 (RAG 群1, 输入蛋白 $\alpha$ 1)	2.16	0.000650645
	含血小板白细胞C激酶底物同系物域, 家族A (磷酸	2.15	0.0256434
	核糖体蛋白L39-样	2.15	0.00429384
	核周蛋白 $\alpha$ 2 (RAG 群1, 输入蛋白 $\alpha$ 1)	2.15	0.000700649
	淀粉状蛋白 $\beta$ (A4) 前体蛋白结合, 家族B, m	2.15	0.00201004
	微染色体维持复合体成分3	2.14	0.0018389
	组蛋白群 1, H2ai	2.14	0.0129155
	染色体 13开放阅读框34	2.14	0.000702936
	RAD18同系物(酿酒酵母)	2.14	0.0016685
	WD重复和HMG框DNA 结合蛋白1	2.13	0.0034833
	硫化物醌还原酶-样 (酵母)	2.13	0.0473641
	染色体 16开放阅读框63	2.12	0.000804179

	M-期 磷蛋白 1	2.12	0.0271814
	微染色体维持复合体成分6	2.12	0.0161279
	同源框A9	2.11	0.00520942
	成纤维细胞生长因子9 (神经胶质激活因子)	2.10	0.0475844
	细胞分裂周期 25同系物C (裂殖酵母)	2.10	0.0169914
	染色体 9开放阅读框64	2.10	0.0265979
	U2AF 同系物基序(UHM)激酶1	2.09	0.0255167
	复制因子 C (激活因子 1) 2, 40kDa	2.09	0.00768959
	预测蛋白 LOC440894	2.09	0.0103358
	小细胞核核糖核蛋白D1多肽16kDa	2.09	0.0334665
	CSE1 染色体分离1-样 (酵母)	2.09	0.0013662
	磷脂酰肌醇聚糖锚生物合成, 类W	2.09	0.0151967
	着丝粒蛋白O	2.09	0.00397056
	序列相似家族20, 成员B	2.09	0.00460031
	预测蛋白 FLJ40869	2.09	0.00444509
[0306]	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白), $\gamma$ 11	2.08	0.00140559
	钙周期蛋白结合蛋白	2.08	0.00524566
	ATP-结合盒, 亚家族E (OABP), 成员 1	2.08	0.00454751
	CD44 分子(印度血型)	2.08	0.000651436
	外切酶体成分 8	2.08	0.00132017
	序列相似家族102, 成员B	2.08	0.025743
	组蛋白群 2, H3d	2.07	0.0102932
	序列相似家族33, 成员A	2.07	0.000318673
	Fanconi贫血, 互补组 B	2.07	0.000255109
	驱动蛋白家族成员22	2.07	0.0192406
	组蛋白群 1, H2ai	2.07	0.0161621
	牛痘相关激酶1	2.06	0.0233182
	整合因子复合体亚基7	2.06	0.000841371
	片状结构特异内切核酸酶 1	2.06	0.006882
	预测蛋白 FLJ25416	2.06	0.000177531
	同向性病毒整合位点 2B	2.06	0.0171408

	视网膜色素变性2 (X-连锁隐性)	2.05	0.0264185
	着丝粒蛋白L	2.05	0.000880856
	Sp1转录激活必需的辅因子, subu	2.04	0.00141809
	染色体 20开放阅读框121	2.04	0.0146323
	序列相似家族72, 成员A	2.04	0.00162905
	序列相似家族72, 成员A	2.04	0.00165234
	真核翻译起始因子1A, X-连锁	2.04	0.00520549
	延伸因子, RNA聚合酶II, 2	2.03	0.0458007
	ATP酶, Na <sup>+</sup>	2.03	0.0189108
	组蛋白群 1, H3a	2.03	0.0244273
	含brix 结构域1	2.03	0.00981178
	含sushi结构域1	2.03	0.0258164
	外核苷三磷酸二磷酸水解酶6 (putativ	2.03	0.00423628
	果糖胺3激酶	2.03	0.00470972
	Bloom 综合征	2.02	0.0209259
[0307]	微管蛋白, $\alpha$ 1c	2.01	0.00862586
	E2F转录因子2	2.01	0.0496479
	外切酶体成分 2	2.01	0.00649147
	驱动蛋白家族成员22	2.01	0.0242075
	LTV1同系物(酿酒酵母)	2.01	0.00812652
	二氢硫辛酰胺S-乙酰转移酶(pyruv的E2成分	2.01	0.00179011
	v-ral猿白血病病毒癌基因同系物B (ras 相关	2.01	0.012225
	环指和WD 重复域3	2.01	0.0013797
	膜联蛋白 A1	2.01	0.0173578
	elaC同系物2 (大肠杆菌)	2.00	0.00266504
	醛脱氢酶 9 家族, 成员A1	2.00	0.00911609
	微管蛋白, $\alpha$ 4a	2.00	0.0435427
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.00	0.00111223
	oculomedin	-2.01	0.00778869
	类似PI-3激酶相关激酶SMG-1	-2.01	0.0356628
	高尔基自身抗原, 高尔基体蛋白亚家族a样假基因	-2.01	0.00770626

	含血影蛋白重复, 核包膜1	-2.01	0.00438469
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.01	0.00117582
	sushi, 巢蛋白和EGF-样域1	-2.01	0.00161129
	整联蛋白, alpha V (玻连蛋白受体, $\alpha$ 多肽	-2.02	0.00252702
	周期蛋白依赖激酶抑制因子 2B (p15,抑制CDK4)	-2.04	0.0150268
	赖氨酰氧化酶样 4	-2.04	0.0120148
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.04	0.000213956
	钙	-2.04	0.00657494
	calsyntenin3	-2.04	0.00300887
	细胞粘附分子1	-2.05	0.0261129
	溶质载体家族22 (有机阳离子转运蛋白),	-2.05	0.0137275
	含RUN 和FYVE 域3	-2.05	0.00387265
	葡糖苷酶, $\alpha$ ; 酸性(Pompe病, 糖原贮积病	-2.05	0.000418401
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.05	0.00988632
	富含脯氨酸核受体辅激活蛋白 1	-2.06	0.0039587
[0308]	膜金属内肽酶	-2.06	0.0152684
	PHD指蛋白21A	-2.06	0.00980401
	Rho GTP酶-激活蛋白	-2.06	0.00705186
	同源框 B6	-2.06	0.00301714
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.07	0.00032839
	磷脂酶 A2 受体 1, 180kDa	-2.07	0.00069343
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.08	0.000352007
	slit 同系物3 (果蝇)	-2.08	0.02844
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.09	0.000414309
	周期蛋白依赖激酶 6	-2.09	0.0456892
	发动蛋白 1	-2.09	0.00139674
	jumonji, 富含AT结合域1B	-2.09	0.00861002
	钙结合和卷曲螺旋域 1	-2.09	0.00370041
	胰岛素样生长因子1受体	-2.09	0.00114467
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.10	0.000377834
	CD82 分子	-2.10	0.0175517

	邻接锌指域的布罗莫结构域, 2B	-2.10	9.88E-05
	---	-2.10	0.00666187
	突触结合蛋白 XI	-2.11	0.0129428
	KIAA1546	-2.11	0.000255634
	jun B 原癌基因	-2.12	0.0120169
	CXXC 指6	-2.12	0.0277527
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.14	0.00282604
	Cdon 同系物 (小鼠)	-2.15	0.0350357
	B-细胞 CLL	-2.15	0.00343507
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.15	0.00263888
	v-abl Abelson鼠科白细胞病毒癌基因同系物 1	-2.16	0.0136688
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.16	0.00583397
	FAT 肿瘤抑制因子同系物1 (果蝇)	-2.18	0.0158766
	转化因子2 $\alpha$	-2.18	0.012256
	嵌合蛋白1	-2.18	0.0287031
[0309]	乳脂肪球-EGF因子8 蛋白	-2.18	0.000987073
	维生素D (1,25- 二羟维生素D3)受体	-2.19	0.000192208
	成神经细胞瘤, 抑制肿瘤发生1	-2.20	0.00090639
	含jumonji 域1A	-2.20	0.0188513
	WNK 赖氨酸缺陷蛋白激酶 1	-2.21	1.57E-05
	原钙粘蛋白 $\beta$ 14	-2.21	0.0103892
	cortactin结合蛋白2	-2.21	2.28E-05
	含WW域转录调控因子 1	-2.22	0.0379899
	周期蛋白L1	-2.22	0.00831474
	活化T细胞核因子, 细胞质, calcine	-2.22	0.00786451
	pellino同系物1 (果蝇)	-2.23	0.00939357
	高尔基自身抗原, 高尔基体蛋白亚家族a样假基因	-2.24	0.00603583
	染色体7开放阅读框10	-2.26	0.00738442
	高尔基自身抗原, 高尔基体蛋白亚家族a样假基因	-2.27	0.00320764
	小Cajal体-特异RNA 17	-2.27	0.0301336
	潜伏转化生长因子 $\beta$ 结合蛋白 2	-2.29	4.08E-05

	高尔基自身抗原, 高尔基体蛋白亚家族a, 8A	-2.29	0.0111179
	抑制蛋白, $\beta$ A (激活蛋白 A, 激活蛋白AB $\alpha$ 多肽)	-2.29	0.00877271
	溶质载体家族41, 成员2	-2.30	0.00453672
	叉头框 P1	-2.30	0.0463138
	基质金属肽酶 14 (膜插入)	-2.31	1.93E-05
	转录因子4	-2.31	0.0367869
	jun 癌基因	-2.32	7.21E-05
	神经上皮细胞转化基因1	-2.33	0.0109689
	asporin	-2.33	0.000659873
	v-fos FBJ 鼠科骨肉瘤病毒癌基因同系物	-2.35	0.0138624
	肝配蛋白-B2	-2.36	0.00611474
	含WD重复和SOCS 框1	-2.36	0.0387851
	类似dJ402H5.2 (类似wo的新蛋白)	-2.36	0.00621503
	含丝氨酸的PX域	-2.38	0.000927628
	胶原, 型VII, $\alpha$ 1 (大疱性表皮松懈, dystro	-2.38	0.00109233
[0310]	AE 结合蛋白1	-2.39	0.000105628
	peroxidase同系物 (果蝇)	-2.40	0.00219049
	钙通道, 电压依赖, L型, $\alpha$ 1C 亚基	-2.41	0.0189661
	Prader-Willi 综合征染色体区 1	-2.45	0.0415526
	中线1 (Opitz	-2.45	0.00130803
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.45	0.00354416
	染色体1开放阅读框54	-2.47	0.0186089
	跨膜蛋白16A	-2.48	0.0481085
	含碱性螺旋环螺旋域, 类 B, 2	-2.49	0.00270257
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.50	0.00316496
	矮小相关转录因子1 (急性髓性白血病	-2.50	0.000607387
	锌指蛋白292	-2.50	0.029832
	纤连蛋白富含亮氨酸跨膜蛋白2	-2.51	0.0135122
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.51	0.00283418
	钾电压门控通道, 亚家族G, 成员1	-2.54	0.0244306
	白介素19	-2.54	0.0310328



	转化生长因子, $\beta$ 3	-2.54	0.0287865
	二氢嘧啶酶-样 3	-2.55	0.0165203
	高尔基自身抗原, 高尔基体蛋白亚家族a, 8B	-2.56	0.0121417
	预测蛋白 PRO2012	-2.57	0.00756704
	SATB 同源框 2	-2.57	0.039781
	t-复合体11 (小鼠)-样2	-2.57	0.0324227
	环指蛋白 122	-2.57	0.0236621
	染色体 8开放阅读框57	-2.59	0.00261522
	含血小板反应蛋白1型基序的ADAM金属肽酶	-2.60	0.0113968
	sushi, von Willebrand因子A型, EGF和五聚环蛋白域	-2.63	2.23E-05
	ST6 $\beta$ -半乳糖酰胺 $\alpha$ -2,6-唾液酸转移酶 2	-2.64	0.0216987
	选蛋白相关含VPS10域受体2	-2.65	0.00936311
	原钙粘蛋白 $\beta$ 9	-2.66	0.0285124
	染色体5开放阅读框13	-2.67	0.00410172
	Enah	-2.68	0.0077547
[0311]	含吡哆醛依赖脱羧酶域2	-2.69	0.00683647
	类似核孔复合体相互作用蛋白	-2.70	0.0187322
	核孔复合体相互作用蛋白	-2.70	0.00368967
	跨膜蛋白 119	-2.70	0.00801387
	染色体14开放阅读框37	-2.70	0.0182453
	含sushi-重复蛋白, X-连锁 2	-2.71	0.0253856
	含PDZ域环指 3	-2.71	0.00931014
	胶原, 型XII, $\alpha$ 1	-2.72	0.000204664
	基质重塑关联5	-2.72	0.000317637
	胶原, 型V, $\alpha$ 1	-2.72	0.0166427
	肌营养不良蛋白关联蛋白2	-2.72	0.0137557
	ATP-结合盒, 亚家族 A (ABC1), 成员1	-2.73	0.00131361
	滋养蛋白	-2.77	0.00298044
	cornichon同系物 3 (果蝇)	-2.78	0.0261738
	形成素结合蛋白1-样	-2.78	0.00290401
	脑和急性白血病, 细胞质	-2.78	0.0476919

	蛋白酪氨酸磷酸酶, 受体型, U	-2.80	0.0270428
	预测蛋白 MGC24103	-2.82	0.0346673
	含解旋酶C域1的干扰素诱导	-2.83	0.0024839
	磷脂转移蛋白	-2.84	0.00999206
	直接早应答 3	-2.87	0.0152127
	直接早应答 3	-2.87	0.0152127
	ADAM 金属肽酶域 12 (meltrin alpha)	-2.87	0.000870288
	突触囊泡糖蛋白 2A	-2.88	0.00704212
	染色体9开放阅读框3	-2.88	0.00410177
	硫氧还蛋白相互作用蛋白	-2.90	0.0135494
	早生长应答1	-2.93	0.000425035
	小核仁RNA, C	-2.94	0.00666866
	小核仁RNA, C	-2.95	0.00765575
	直接早应答3	-2.99	0.0167309
	低密度脂蛋白相关蛋白1 ( $\alpha$ 2macro glo	-2.99	4.26E-05
[0312]	二尾C 同系物1 (果蝇)	-2.99	0.0347162
	同源框 B2	-3.03	0.00665994
	小核仁RNA, C	-3.10	0.0274043
	小核仁RNA, C	-3.10	0.0274043
	基质金属肽酶2 (明胶酶A, 72kDa 明胶酶,	-3.13	5.59E-05
	KIAA1641	-3.14	0.00659194
	胶原, 型VI, $\alpha$ 3	-3.14	2.09E-06
	同源框 A2	-3.15	0.0435423
	SH3和PX域2B	-3.15	0.0244357
	胶原, 型VI, $\alpha$ 2	-3.16	0.0149554
	染色体9 开放阅读框 3	-3.21	0.0233723
	小核仁RNA, C	-3.24	0.0104491
	小核仁RNA, C	-3.24	0.0104491
	---	-3.27	0.00488845
	UDP-N-乙酰- $\alpha$ -D半乳糖胺:多肽N-乙酰基ga	-3.35	0.00964109
	胆固醇25-羟化酶	-3.38	0.0445558

	KIAA1641	-3.40	0.013175
	环指蛋白 144	-3.40	0.0135334
	多功能蛋白聚糖	-3.41	0.023885
	血管生成素-样2	-3.42	0.0245161
	KIAA1641	-3.44	0.0170531
	FBJ鼠科骨肉瘤病毒癌基因同系物B	-3.54	0.00025573
	类似RIKEN cDNA 1110018M03	-3.59	0.00516476
	早期生长应答 2 (Krox-20 同系物, 果蝇)	-3.62	0.00821813
	dachsous 1 (果蝇)	-3.63	0.00697244
	驱动蛋白家族成员 26B	-3.64	0.00363199
	无末端同源框5	-3.66	0.000640157
	类似蛋白质KIAA0220	-3.69	0.0302619
	胰岛素样生长因子1受体	-3.71	3.42E-05
	蛋白质酪氨酸磷酸酶, 受体型, N	-3.77	0.0294569
	KIAA1641	-3.85	0.0191782
[0313]	含sushi重复蛋白, X连锁	-3.85	0.00370941
	微纤维关联蛋白2	-3.91	0.0152901
	补体成分 1, s 子成分	-3.97	0.0395863
	CD24分子	-3.99	0.0340122
	同源框 B3	-4.02	0.0354368
	毛-鼻-指综合征I	-4.02	0.00557712
	Kallmann综合征 1 序列	-4.04	0.000548703
	含富含亮氨酸重复17	-4.09	0.0263961
	含丛蛋白域2	-4.32	0.031799
	PTK7蛋白酪氨酸激酶7	-4.42	0.000116114
	supervillin	-4.43	0.0412717
	锌指蛋白521	-4.58	0.00668815
	钙结合蛋白2, 29kDa (钙视网膜蛋白)	-4.77	0.0290743
	ras 同系物基因家族, 成员J	-4.79	0.00197982
	整联蛋白, $\alpha$ 11	-4.80	0.000390317
	odz, 奇Oz	-5.05	0.00172671

	F-框蛋白32	-5.52	0.0212957
	raftlin家族成员 2	-5.72	0.0260454
	丛生蛋白	-5.74	0.0303973
	neurotrimin	-5.79	3.78E-06
	WNT1可诱导信号传导途径蛋白1	-5.86	0.000672342
	胰岛素样生长因子结合蛋白5	-6.34	0.011614
	硫酸酯酶2	-6.34	5.88E-05
	微纤维关联蛋白4	-6.93	0.00155578
	连接粘附分子 2	-7.07	0.0306758
[0314]	含纤连蛋白III型域1	-7.29	0.0334696
	肌蛋白聚糖, $\delta$ (35kDa 肌营养不良蛋白-关联糖蛋白	-7.37	0.000881984
	hephaestin	-7.53	0.0123141
	丝氨酸蛋白酶抑制物肽酶抑制物,进化枝F( $\alpha$ 2抗纤溶酶	-7.66	0.00362941
	半胱氨酸蛋白酶抑制剂SN	-7.96	0.0496433
	hemicentin1	-8.18	0.0461603
	腱生蛋白C(六臂)	-8.32	8.26E-05
	二聚糖	-8.62	0.00161284
	跨膜, 前列腺雄激素诱导 RNA	-11.20	0.000100935
	羧肽酶E	-11.22	0.00738131

[0315] PLX-C细胞上细胞标记的表达-用单克隆抗体检测PLX-C表达的表面抗原。结果表明PLX-C以阳性标记:CD73、CD29和CD105以及阴性标记:CD34、CD45、CD19、CD14和HLA-DR(数据未显示)为特征。免疫表型测定规格设定为所有阳性标记 $\geq 90\%$ 且所有阴性标记 $\leq 3\%$ 。

[0316] 而且,如图10A-B所示,PLX-C培养物不表达内皮标记,如两个内皮标记CD31和KDR的阴性染色所示。然而,成纤维细胞典型标记的PLXC表达是明显的(D7-fib的表达,图10C)。

[0317] PLX-C细胞的免疫原性和免疫调节性质-由于PLX-C由源自胎盘的粘附细胞组成,其预期表达HLA I类分子,这些分子表达于所有的身体细胞并且已知诱导同种异体反应性免疫应答。HLA II类分子和其他共刺激分子典型地仅表达于抗原递呈细胞(APCs)表面。

[0318] 为了检测所得PLX-C细胞的免疫原性,在这些细胞膜的表面进行共刺激因子的表达。FACS分析证明PLX-C细胞膜上不存在CD80、CD86和CD40(图11A-C)。此外,如通过HLA A/B/C染色所示(图11D),PLX-C表达低水平的HLA I类分子。刺激分子和共刺激分子的表达类似于源自骨髓的MSC(如图11A-D所示)。

[0319] 为了进一步研究PLX-C细胞的免疫原性和免疫调节性质,进行混合淋巴细胞反应(MLR)检测。如图12A-B所示,如通过胸腺嘧啶掺入测量,PLX-C细胞逃避同种异体识别并降低T细胞应答。而且,随着PLX-C细胞数量的增加(以剂量依赖方式)淋巴细胞增殖的减少(通过CPM测量评估)更高。PLX-C在丝裂原刺激例如Concavalin A(Con A,图12B)和植物凝集素(PHA)以及抗-CD3和抗-CD28(数据未显示)的非特异刺激后也降低淋巴细胞增殖。

[0320] 为了研究PLX-C免疫调节淋巴细胞增殖的作用机制以及判断该作用是否由细胞与

细胞间的相互作用或细胞因子分泌介导,采用transwell法(其防止细胞与细胞的接触但是允许两个区室之间细胞因子的扩散)用PHA刺激源自PB的单核细胞。结果显示甚至当抑制了细胞与细胞间的接触时仍维持增殖抑制(数据未显示)。

[0321] 细胞因子分泌-如上文所述,PLX-C很可能通过可溶性因子降低淋巴细胞的增殖速率。进一步研究淋巴细胞响应PLX-C分泌的细胞因子以阐明PLX-C的作用机制。如图13A-B所述,与PLX-C一起培养单核细胞稍稍减少促炎症反应细胞因子 $\text{INF } \gamma$ 的分泌并显著减少 $\text{TNF}\alpha$ 的分泌(甚至在少量PLX-C的存在下)。此外,在脂多糖(LPS)刺激后,源自PB的MNC的IL-10分泌在PLX-C存在下增加,而 $\text{TNF}\alpha$ 的分泌水平以剂量依赖方式降低(图13C)。

[0322] 实施例5

[0323] PLX-C的生物分布

[0324] 材料和实验方法

[0325] 用萤光素酶表达载体转染PLX-C细胞

[0326] 用表达在CMV启动子控制下的萤光素酶基因的慢病毒构建体(图14)稳定转染PLX-C细胞。

[0327] 感染病毒的产生

[0328] 转染前使293TN生产细胞在添加了血清和抗生素的DMEM培养基(Gibco)中生长2-3天(50-70%汇合)。将10 $\mu\text{g}$ 包装质粒和2 $\mu\text{g}$ 表达构建体以及20  $\mu\text{l}$  Plus<sup>TM</sup>试剂(Invitrogen)的混合物加入400  $\mu\text{l}$ 无添加物的DMEM中。将混合物与Lipofectamine<sup>TM</sup>(加入400  $\mu\text{l}$  DMEM中的30 $\mu\text{l}$ 稀释物)在室温(RT)下孵育15分钟。将混合物在RT孵育15分钟。洗涤293TN细胞并转移至2%血清培养基并加入转染混合物。将细胞在CO<sub>2</sub>培养箱中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜并在感染后24-60小时收集培养基。48小时后达到峰病毒产生。收集培养基,于室温3000rpm离心5分钟沉淀细胞碎片。离心后,将上清滤过Millex-HV 0.45 $\mu\text{m}$  PVDF滤器(Millipore, Cat.# SLHVR25LS)。

[0329] PLX-C的感染

[0330] 病毒感染前24小时以0.6-1 $\times 10^5$ 个细胞每孔的密度将PLX-C细胞接种于24孔板中的完全培养基中。24小时后,加入0.5ml病毒悬液(以终浓度5-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 稀释于含Polybrene的完全培养基中)。将细胞孵育24小时,然后用完全DEME培养基置换培养基并将细胞于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub>孵育过夜。第4天,培养物达到汇合并1:3至1:5分裂,使细胞在完全DEME中生长48小时,然后分析细胞的萤光素酶表达。

[0331] 感染的有效率接近100%。用IVIS Lumina成像系统进行活细胞和活体小鼠中的发光评估,该系统包括捕获萤光素酶发光信号的高灵敏CCD相机。

[0332] 感染后两周,将2 $\times 10^6$ 个细胞IM或IV注射到SCID/Beige、NOD/SCID、SCID和Balb/C小鼠。用所述IVIS系统监测注射的细胞。

[0333] 试验结果

[0334] 如从结果所见,感染后CXL细胞继续分化且生长细胞中萤光素酶的表达水平保持强烈并稳定(图15)。

[0335] 一旦将PLX-C细胞注入Balb/C小鼠,检测生物分布模式。如从结果所见,IM注射后72小时细胞消失(数据未显示)。然而,PLX-C细胞体外保持多于三周的恒定高水平萤光素酶

表达(数据未显示)。

[0336] 如图16A-D所示,IM注射到SCID/Beige免疫缺陷小鼠的细胞在注射部位保留了多达5天且之后未观察到。IV注射到SCID/Beige小鼠的CXL细胞24小时后迁移至肺,然后至注射位点(推测归巢至损伤部位)。之后细胞逐渐消失且3-4周后未观察到。

[0337] 实施例6

[0338] 粘附细胞可体内治疗肢体缺血

[0339] 为了测定移植源自胎盘的粘附细胞是否可以减少缺血损伤并改善临床和运动功能,如下采用后肢缺血模型。

[0340] 材料和实验方法

[0341] 后肢缺血模型-在非免疫缺陷的8-10周龄体重约25g±20%的20只雄性Balb/c小鼠中诱导后肢缺血。根据国立卫生研究院(NIH)和实验动物管理评估及认证协会(AAALAC)进行动物处理。在标准实验室条件下饲养动物。将动物饲养在气候可控的环境中。温度范围在20-24℃之间且相对湿度(RH)为30-70%之间,12小时光照和12小时黑暗循环。

[0342] 用计算机生成的随机化程序“Research Randomizer”将动物随机化并分成2组,每组10只动物。一组接受肌肉内(IM)注射 $1 \times 10^6$ 个源自胎盘的粘附细胞(PLX-C),另一组作为对照并注射PBS。

[0343] 手术操作-在腹股沟区域的皮肤上行1-1.5cm切口。用6-0丝线将股动脉结扎两次并切断结扎线远端。用3-0丝线缝合伤口并使小鼠恢复。手术切除一端股动脉5小时后在两个给药位点给小鼠IM注射总体积为50μl的 $1 \times 10^6$ 个源自胎盘的粘附细胞(PLX-C)。对照组动物同样用PBS(Gibco)注射,见下表6。

[0344] 表6:在小鼠后肢缺血模型中PLX-C的初步研究

[0345]

实验组	处理	每组小鼠 数数量	细胞 剂量	批次	处死时间 给药后21天
1	PLX-C i.m	n=10 ♂	1x10 <sup>6</sup>	C.G.13.0	n=10 ♂
2	PBS i.m	n=10 ♂	0	N/A	n=10 ♂

[0346] 追踪观察-手术后随即和手术后第6、9、14和21天用非接触激光多普勒仪连续3次测量腿两边的血流,且表述为缺血肢与正常肢血流的比[Tokai.J.等]。

[0347] 缺血严重性的肉眼评估-用坏死区域的分级形态学量表在第1、6、9、14、21天肉眼评估缺血肢直至研究终结;0级:无坏死,I级:仅限于脚趾的坏死(脚趾丧失),II级:延伸至足背的坏死(足丧失);III级:延伸至脚的坏死(膝丧失),IV级:延伸至大腿的坏死(完全后肢丧失)[Tokai.J.等]。

[0348] 体内评估肢体功能和缺血损伤-如下系列进行缺血肢受损用途的半定量评价:3=拖足,2=无拖足但无跖屈,1=跖屈,以及0=弯曲脚趾以抵抗对尾巴的轻微牵引(Rutherford等,1997)。

[0349] 分子和生物化学分析-除了临床评估,在第21天获取分子和生物化学样品并进行分析以更好地了解引起注射源自胎盘的粘附细胞(PLX-C)组愈合改善的分子机制。

[0350] 实验结果

[0351] 移植源自胎盘的粘附细胞显著诱导缺血后肢模型的髁和足的血流-为了检测粘附细胞的体内功效,将小鼠动脉结扎后肌肉注射源自胎盘的粘附细胞并在治疗后在预定时间段使用非接触激光多普勒仪测量测量髁和足(身体两侧)的血流。如图17所示,注射PLX-C显著改善至受损肢的血流(BF)(如通过血流评估所测定)、增强肢体功能、增加毛细血管密度、减少氧化应激和内皮损伤。就血流而言,注射后9天验证了该作用并可在整个实验中观察到。在PLX-C处理组中,BF从 $24 \pm 2.3$ 增加至 $80 \pm 4.7\%$ ,而在对照中,载体处理组的BF在 $35 \pm 2$ 至 $54 \pm 4.5\%$ 的范围内-在髁/移植区(分别为第0天对比第21天)。与髁区域相似,但是程度更小,PLX-C处理小鼠的爪区域也显示了BF的增加。因此,在载体处理组中BF从 $12 \pm 0.6$ 增加至 $46 \pm 4.9\%$ ,而在PLX-C组中BF从 $10 \pm 0.7$ 增加至 $52 \pm 5.5\%$ (分别为第0天对比第21天),如图17所示。

[0352] 粘附细胞可体内改善肢体功能-为了进一步评价源自胎盘的粘附细胞的体内作用,用上文材料和实验方法中描述的评分系统评估被处理小鼠中的肢体功能。如图18所示,用粘附细胞处理的小鼠显示肢体功能的显著改善(分别为 $2.5 \pm 0.2$ 对比 $2.1 \pm 0.2$ 对照对比PLX-C组,注意到处理后第21天的显著作用)。然而,在21天观察中的肢体功能的改善程度是可比的,表明在本实验条件下PLX-C未显示功能恢复的主要变化。

[0353] 缺血严重性的肉眼评估揭示了在对照即载体处理组中,在第6天在两只动物中观察到限于脚趾的坏死。在PLX-C处理组中,仅在14天后仅在一只动物中显示出限于脚趾的坏死。用PLX-C处理的肢体的死后免疫组织化学分析表明供给肢体的新毛细血管(血管)的数量显著增加,表明PLX-C具有促进血管生成的能力(图19)。

[0354] 最后,在PLX-C处理小鼠中观察到处理动物中氧化应激降低和内皮炎症减少(其为内皮功能改善的替代参数)(图20A-B)。这很可能是由于用PLX-C细胞处理的小鼠中而不是用PBS处理的对照小鼠中氧气供给增加。

[0355] 总之,与对照即PBS-注射小鼠相比,没有一只PLX-C注射小鼠显示响应肌肉内(i.m.)细胞施用的任何不良临床体征或症状。因此,PLX-C诱导血流增加,很可能由如受损肢体的组织学评估支持的血管生成引起。此外,坏死发展的延迟和受累动物数量的差异均表明临床反应。

[0356] 源自胎盘的粘附细胞的移植

[0357] 在Ba1b/C小鼠中实施另一有效性实验,其包括如上文材料和方法部分中所述的安全终点(即所选器官的总体坏死和组织病理学分析)。

[0358] 在这一实验中,使用各由10只雄性Ba1b/c小鼠(缺血后肢)组成的七组小鼠,如下文表7详述。10只小鼠的一个单组未诱导缺血(以检测PLX-C细胞在正常、健康动物中的总体安全性和耐受性)。诱导缺血后,将对照缓冲液或PLX-C细胞i.m.给予受累肢,给药后观察小鼠至1个月。一个单组的小鼠接受受累肢的两次单独注射,之间相隔1周(第1和第8天)。通过激光多普勒仪分析监测血流,通过肉眼和行为评估缺血严重性至给药后30天,此时将小鼠处死并保留组织用于组织学分析。

[0359] 表7:小鼠后肢缺血模型中PLX-C的功效实验

[0360]

实验组 编号	处理	细胞量 (剂量)	处理数量	批次	处死时间 给药后 30天
1	PLX-C	$1 \times 10^6$	1	C.G.13.0	10 ♂
2	PLX-C	$1 \times 10^6$	1	C.G.25.0	10 ♂
3	PLX-C	$1 \times 10^6$	2	C.G.25.0	10 ♂
4	PLX-C	$0.5 \times 10^6$	1	C.G.13.0	10 ♂
5	PLX-C	$0.1 \times 10^6$	1	C.G.13.0	10 ♂
6	对照冷冻 培养基	N/A	1	N/A	10 ♂
7*	PLX-C	$1 \times 10^6$	1	C.G.13.0 C.G.25.0	10 ♂

[0361] 在这一实验中,使用三个浓度的不同PLX-C批次。结果显示 $0.1 \times 10^6$ 和 $0.5 \times 10^6$ PLX-C具有很小的治疗益处。在用 $1 \times 10^6$ 处理的动物中在第29天(实验结束时)观察到血流的显著的改善。与对照即载体注射小鼠相比,2M组(批次G.C25)中这一血流的改善是显著的( $p < 0.05$ )。此外,与单次注射相比,第二次注射相同批次的细胞在第15天显著改善BF(分别为 $55 \pm 24$ 对比 $31 \pm 12.9$ 和 $27 \pm 12.5\%$ )。缺血严重性的肉眼评估表明与对照载体处理组(6M)相比在接受 $1 \times 10^6$ (1M&2M)的组中有改善的趋势。

[0362] 这些结果综合起来表明粘附细胞在诱导血管化作用(例如血流)和改善后肢缺血小鼠模型肢体功能中的功效并表明了这些细胞(例如源自胎盘的粘附细胞)在治疗缺血肢体疾病中的用途。

[0363] 实施例7

[0364] 用于治疗中风的PLX-C

[0365] 本研究的目的在于评估全身(静脉内)移植人PLX-C(源自胎盘的粘附细胞)在治疗中风中的治疗功效。

[0366] 材料和实验方法

[0367] 受试者、手术和移植

[0368] 使用患高血压、血胆固醇过多、糖尿病和微血管病的雄性自发性高血压大鼠。将动物饲养在温度、空气湿度和光照/黑暗循环恒定的条件下。将受试者随机分配到实验组(见下表8)。

[0369] 表8:中风治疗中的大鼠处理组

[0370]

组编号	处理	动物数
1	PLX-C, 批次1单次施用	N=8
2	PLX-C, 批次1两次施用	N=7
3	PLX-C, 批次2单次施用	N=8
4	PLX-C, 批次2两次施用	N=7
5	对照-载体溶液	N=12

[0371] 动物接受单次或两次不同批次的 $1 \times 10^6$ PLX-C剂量。所有移植操作均静脉内实施。两次注射组在脑缺血10和24小时后移植,而单次移植在中风后24小时进行。所有被移植的细胞用荧光染料PKH26预标记。



[0372] 实验性脑缺血通过永久性闭塞右大脑动脉实施。应注意一只动物在麻醉后死亡。

[0373] 磁共振研究(MRI)

[0374] 损伤发展的MRI在第1、8、29和60天用1.5T扫描仪(Philips)进行。测量梗死体积和脑萎缩并使用冠状T2-序列计算为三个盲研究者所得数值的平均值。

[0375] 行为检测

[0376] 通过使用两个独立的行为检测阵列测量功能变化。走横梁实验为用于定量感觉-运动缺陷的常用检测。使大鼠跑过水平放置的棒,大鼠的笼子在棒末端。测量五次穿越时间并记录为日间平均值。悬停在横梁上评定为20秒,摔落为30秒。第一周内每日以及每七天进行测量直到观察期结束。

[0377] 第二个检测即经修改的神经学严重度评分(mNSS)包含附加的感觉、运动和反射项目。mNSS的结果表示为1到18之间的评分,其中1到6之间的分数表示轻度,7到12为中度且13到18为严重损伤。在脑缺血后第1、4、7、14、21、28、35、42、49和56天进行mNSS评分评估。

[0378] 组织学

[0379] 实验期结束之后,处死所有大鼠并经心脏灌注4%的福尔马林溶液。将提取的脑组织冷冻保存并切成30 $\mu$ m厚的切片。对于神经胶质反应的评估,用抗GFAP的一抗进行免疫组织化学研究。检验(半定量)靠近梗死边界的750 $\mu$ m宽的区域GFAP+细胞密度。对于星形神经胶质细胞反应性的检测,包括平均间隔0.6mm的15个区域。

[0380] 统计学

[0381] 研究所有关于体重、MRI分析和组织学检验的数据的高斯分布并用ANOVA以及相应的等级ANOVA分析统计学显著差异。

[0382] 将走横梁和mNSS实验中收集的数据进行详细的统计学分析,应考虑受试者的重复测量以及各受试者的短暂进展(分层分析)。为了平衡关于脑损伤程度的个体间差异,使用随机截距模型。因此走横梁实验中收集的数据需转化至分类系统。在此,小于5秒的时间值认为是类别(0),5至10秒为类别(1),10至15秒为类别(2)、15至20秒为类别(3),悬停为类别(4)以及摔落为类别(5)。

[0383] 实验结果

[0384] 体重

[0385] 周期性称重使得可以很好的估算受试者的整体健康状态。在所有组中观察到初期体重减少,归因于麻醉和手术介入(数据未显示)。接着,观察到体重迅速正常化和稳定病程直到第60天实验结束(数据未显示)。实验组显示对应的体重增加。

[0386] 走横梁实验

[0387] 在试验过程中所有的实验组均显示走横梁类别的显著降低(数据未显示)。与对照组(分别为-0.01247对比-0.02931)相比,在试验组1(PLX-C批次1单次施用)中观察到走横梁类别的显著较低降低。实验组3(PLX-C批次2单次施用)和对照组(数据未显示)之间没有统计学显著差异的证据。

[0388] 修饰的神经学严重度评分(mNss)

[0389] 所有实验组显示了神经学评分点的显著降低(数据未显示)。比较用PLX-2(PLX-C二次给药)治疗的受试者的mNSS结果揭示出与对照组相比的统计学显著的优越性。批次2(组3)的两次重复移植显示与相同批次的简单注射相比在mNSS试验中显著的改善。

### [0390] 梗死体积测量

[0391] 磁共振成像是一种用于估算体内脑损伤和组织丧失的高度精细的方法。考虑个体间的波动,将梗死体积的进展各自表示为第1天梗死体积的百分数。实验组之间第1天的梗死体积没有显著差异。第1天和第8天之间梗死体积的整体发展显示约50%的减少。这主要归因于初期脑水肿退行。用MRI检测损伤体内进展表明组4 (PLX-C批次2两次施用) 受试者在第60天显示显著降低的梗死系数(分别为 $0.48 \pm 0.02$ 对比 $0.60 \pm 0.03$ ,结果未显示)。

[0392] 这些结果综合起来表明血管内给予PLX-C引起中风治疗中两个行为检测中功能恢复的显著改善。而且,相对于类似的单次注射观察到PLX-C两次移植的相当大且统计学显著的优势。

[0393] 用PLX-C治疗两次的受试者中经MRI测量的行为改善的确证是明显的。此外,在试验结束时观察到梗死体积和脑萎缩的显著降低。而且,在两个功能检测中与对照和单次注射后未验证的作用相比,观察到两次剂量移植PLX-C后对功能恢复的稳定改善。

### [0394] 实施例8

[0395] 治疗需要结缔组织再生和/或修复的病理

[0396] 使用本发明粘附细胞治疗需要骨再生和/或修复的病理

[0397] 用动物模型(例如,成熟新西兰白兔)检测本发明粘附细胞(其源自胎盘或脂肪组织并获自3D培养,例如PLX-C细胞)在股骨临界大小节段缺损愈合中的作用。将动物随机分配到三组中的一组。向A组动物缺损部位注射 $1-10 \times 10^6$ 个粘附细胞(PLX-C细胞)。B组动物注射PBS。在C组动物中,不处理缺损。手术后立即和间隔一周制得放射照片。在第12周,处死动物,去除所涉及的股骨,制备来自缺损和邻近骨的未脱钙组织切片。进行机械的、组织学的和组织形态测定实验以检测缺损的愈合以及缺损部位中和周围的骨形成。此外,进行逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测I型和II型胶原的mRNA。

[0398] 用本发明粘附细胞治疗需要腱再生和/或修复的病理

[0399] 用动物模型(例如,骨骼成熟的新西兰白兔)检测本发明粘附细胞(例如PLX-C细胞)对腱愈合的作用。将拇趾长肌腱转移至2.5-mm直径的跟骨隧道中。使用或不使用PLX-C治疗骨隧道。将动物随机分配到三组中的一组。向A组动物缺损部位注射或IV注射 $1-10 \times 10^6$ 个PLX-C细胞。B组动物注射PBS。在C组动物中,不处理缺损。在手术后第2、4和6周收获来自各组的三个样品并通过使用常规的组织学和免疫组织化学定位I、II和III型胶原进行愈合的腱到骨界面的形态学特性的评估。

[0400] 用本发明粘附细胞治疗需要软骨再生和/或修复的病理

[0401] 用动物模型(例如,骨骼成熟的新西兰白兔)检测本发明粘附细胞(例如PLX-C细胞)对软骨愈合的作用。施行左股骨远端髌骨沟关节软骨的全层缺损。从覆盖四头肌的筋膜移除约6mm的皮瓣并用6-0肠线缝合至人为缺损的边缘。将动物随机分配到三组中的一组。向A组动物缺损部位注射或IV注射 $1-10 \times 10^6$ 个PLX-C细胞。B组动物注射PBS。在C组动物中,不处理缺损。处死动物。移植PLX-C细胞至骨软骨缺损上十四周之后,切除股骨远端并进行组织学评估,基于修复组织的优势性质、基质染色、表面的规则性、结构完整性、修复厚度、修复软骨和周围正常软骨之间的对合、修复组织中无退化征兆以及周围正常软骨无退化性变化对样品半定量分级。

[0402] 用本发明粘附细胞治疗需要韧带再生和/或修复的病理

[0403] 用动物模型(例如,骨骼成熟的新西兰白兔)检测本发明粘附细胞(例如PLX-C细胞)对韧带愈合的作用。施行直径8mm的单皮质圆形缺损。将动物随机分配到三组中的一组。向A组动物缺损部位注射或IV注射 $1-10 \times 10^6$ 个PLX-C细胞。B组动物注射PBS。在C组动物中,不处理缺损。移植PLX-C细胞至韧带缺损上十四周后处死动物。进行组织学评估并根据修复组织的优势性质对样本半定量分级。

[0404] 应该了解,为清楚起见,在单独实施方案的上下文中所阐述的本发明的某些特征也可在单个实施方案中组合提供。反之,为简短起见,在单个实施方案上下文中所阐述的本发明的各种特征,也可分开或以任何合适的亚组合提供。

[0405] 尽管本发明联合其具体实施方案已得到阐述,但显然很多备选、修改和变更对于本领域技术人员来说将显而易见。因此,意欲包括落在附加权利要求的精神和广泛范围内的所有这样的备选、修改和变化。本说明书所提到的所有出版物、专利和专利申请和GenBank登录号以其整体通过引入本说明书在此并入,其程度如同明确并单独地指出将每一单独出版物、专利或专利申请或GeneBank登录号在此通过引用并入一样。另外,本申请中的任何参考的引用或鉴定不应该被理解为承认这样的参考可用作本发明的现有技术。

[0406] REFERENCES

[0407] (Additional References are cited in text)

[0408] Bauer,Thomas W.,Muschler,George F.,Bone Graft Materials:An Overview of the Basic Science.Clinical Orthopaedics&Related Research.371:10-27, February 2000.

[0409] Carstanjen B,Desbois C.,Hekmati M,and Behr L.Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse.Can J Vet Res.2006 April;70(2):143-147.

[0410] Bruder SP,et al.1998 The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects.J Bone Joint Surg Am.80(7):985-96

[0411] Chao Wan,Qiling He,Gang Li,2006.Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells(MSCs)enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model.Journal of Orthopaedic Research 24(4)610-618.

[0412] Herthel D.J.2001,Enhanced Suspensory Ligament Healing in 100 Horses by Stem Cells and Other Bone Marrow Components.AAEP PROCEEDINGS/Vol.47.

[0413] Gordon et al,Tendon Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells.p313-320 in Tendon Injuries.Springer London.2005.

[0414] Horwitz et al.,1999.Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta.Nat.Med.5:309-313.

[0415] Horwitz et al.,2002.Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta:Implications for cell therapy of bone.PNAS 99(13)8932-8937.

[0416] Livingston,T.L.2003 Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration.Journal of Materials Science:Volume 14(3):211-218.

[0417] Young et al.1998.Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair.J Orthop Res.16(4):406-13.



图1A 图1B



图1C 图1D



图1E 图1F

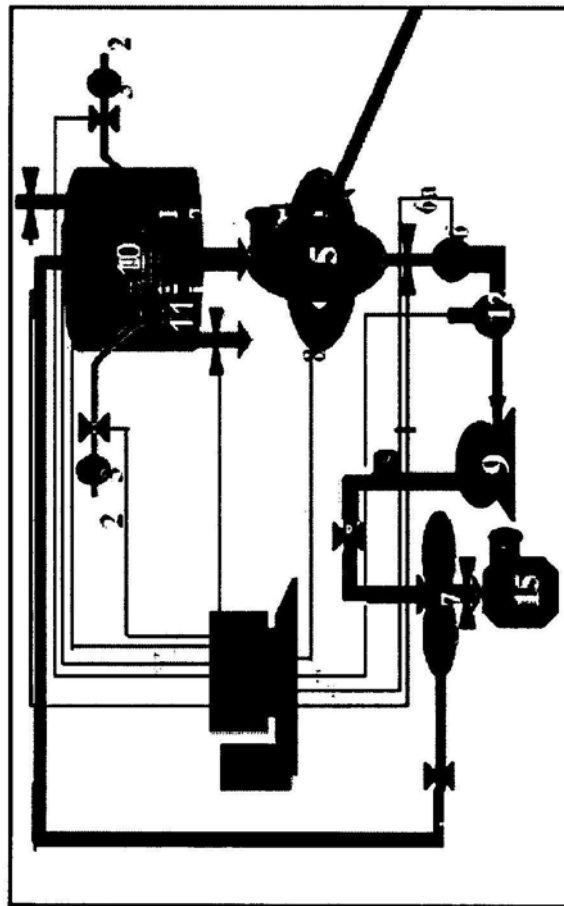


图1G

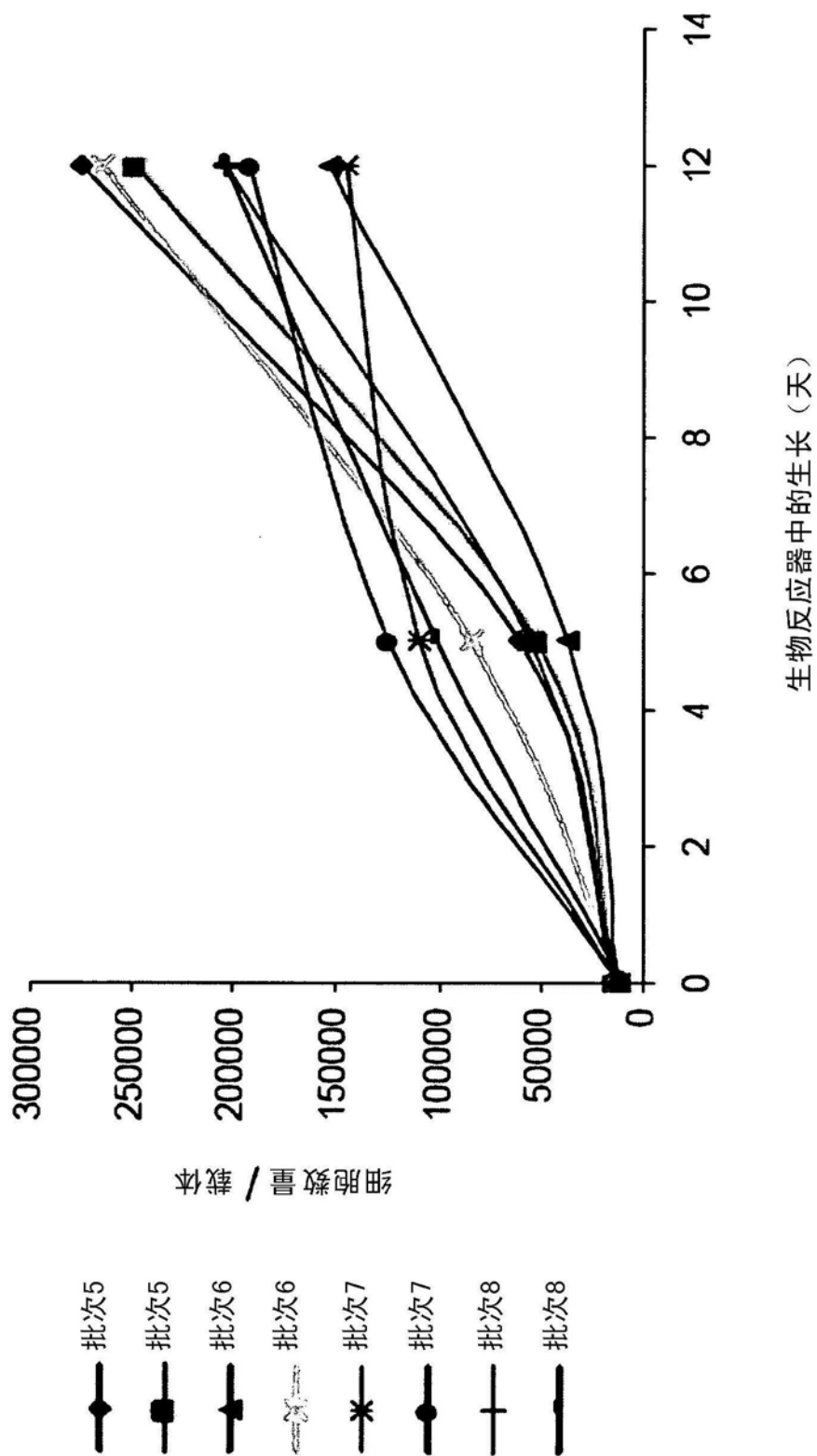


图2

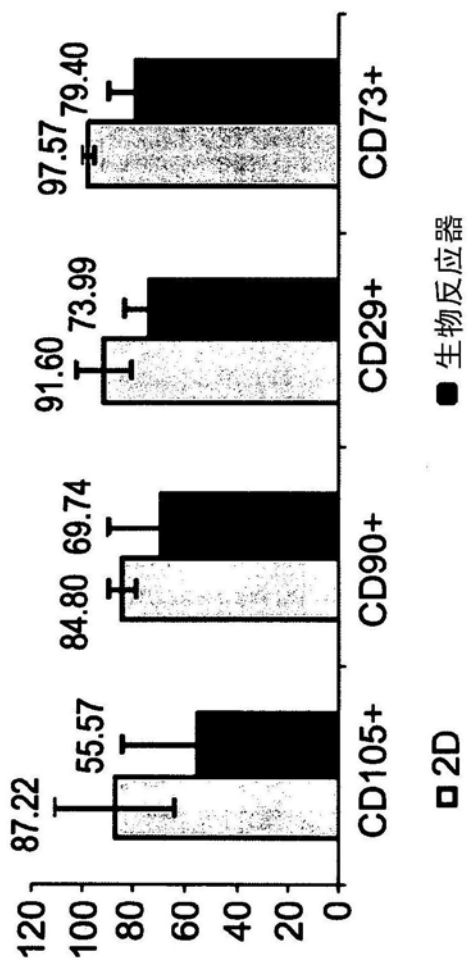


图3A



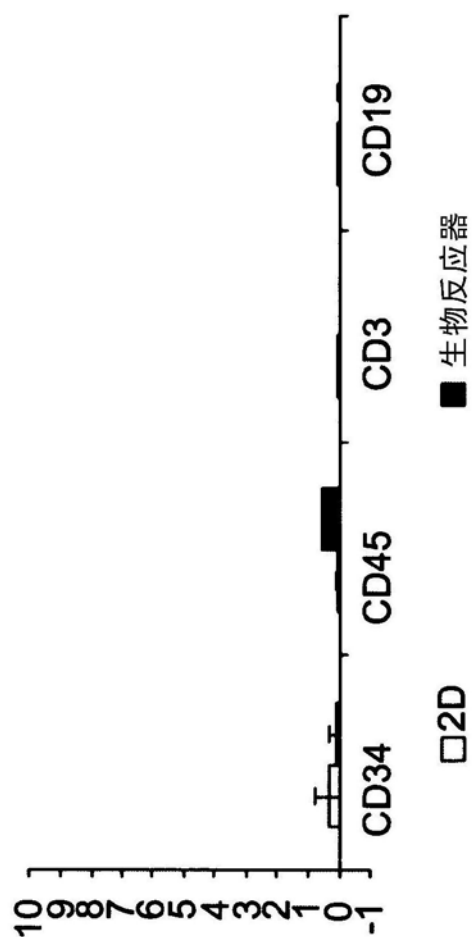


图3B

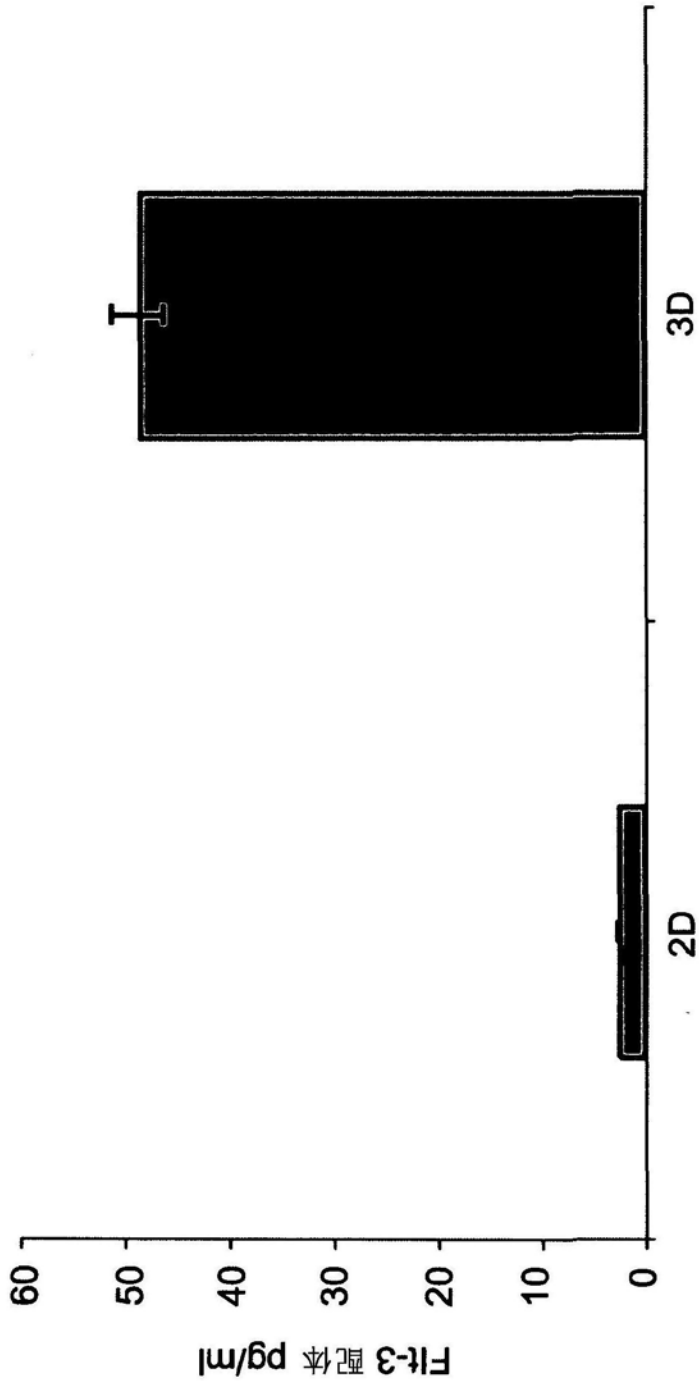


图4A

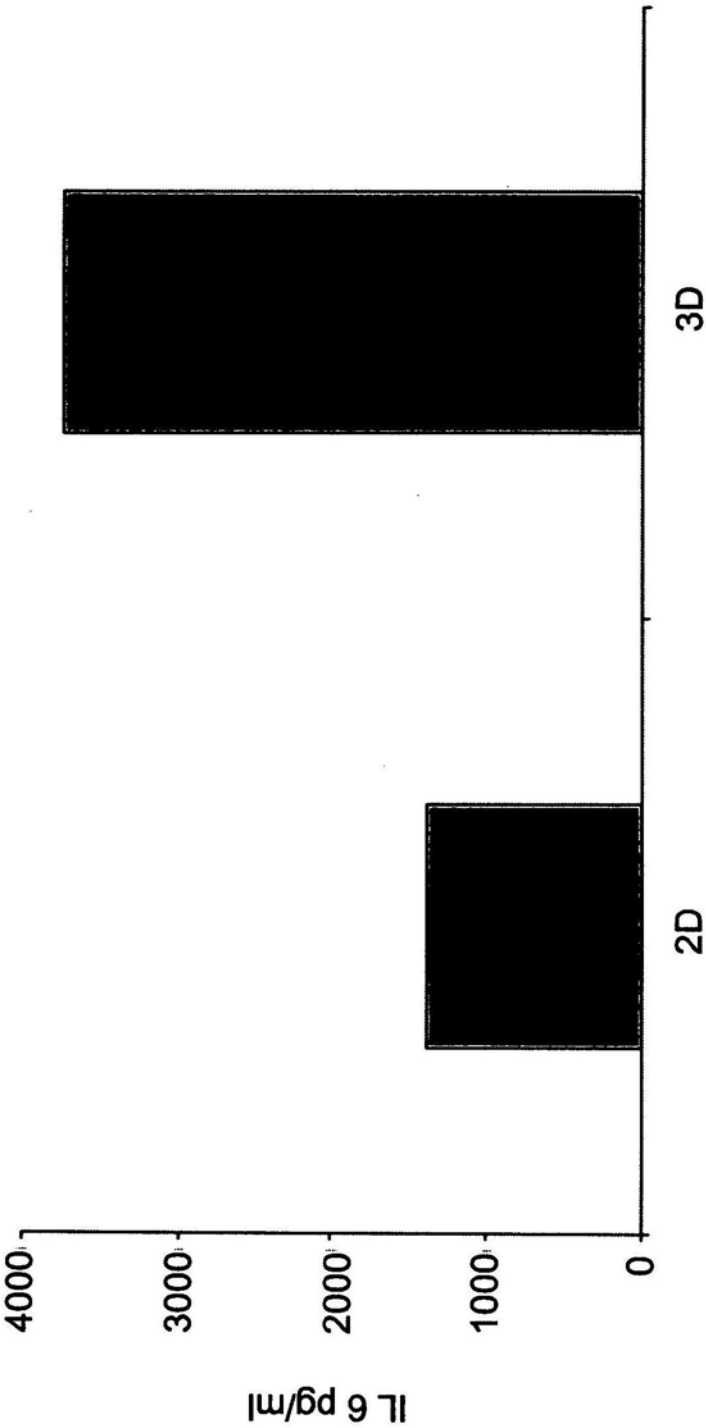


图4B

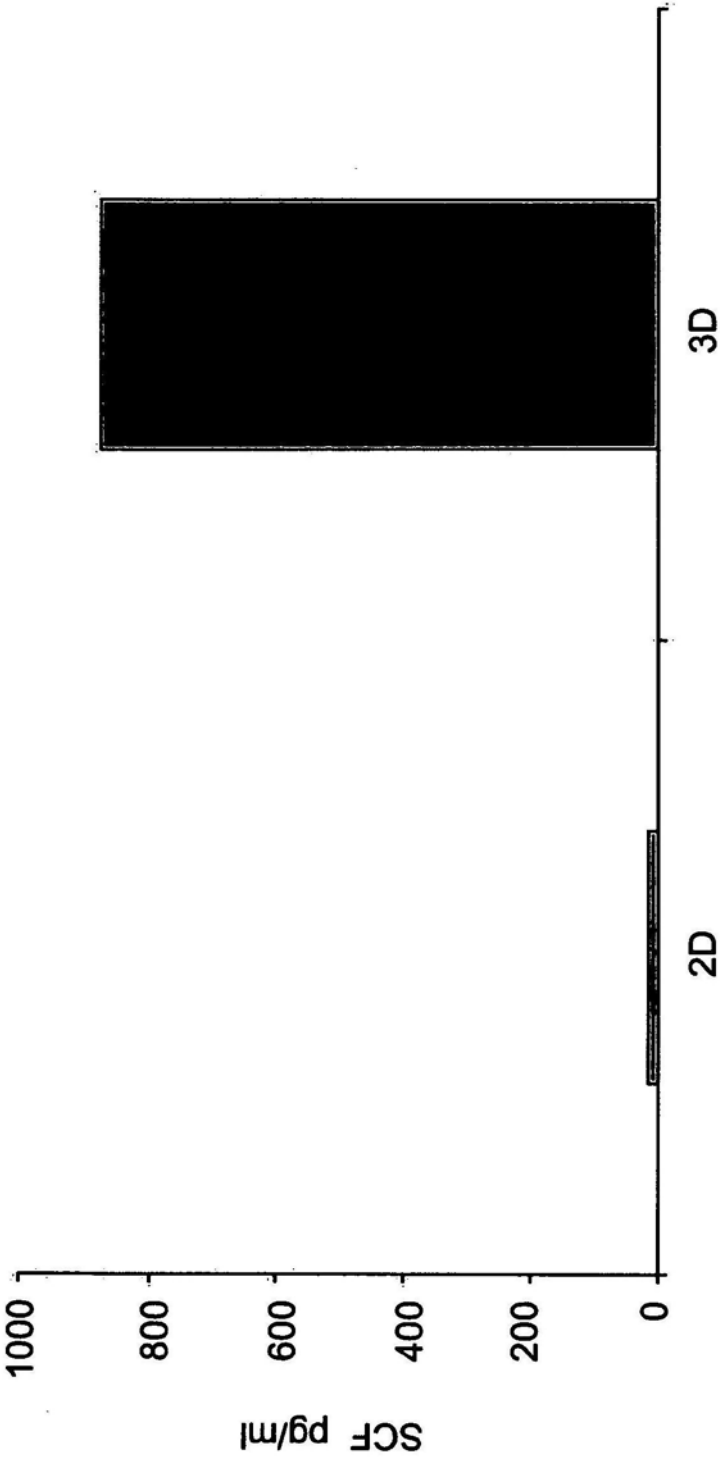


图4C

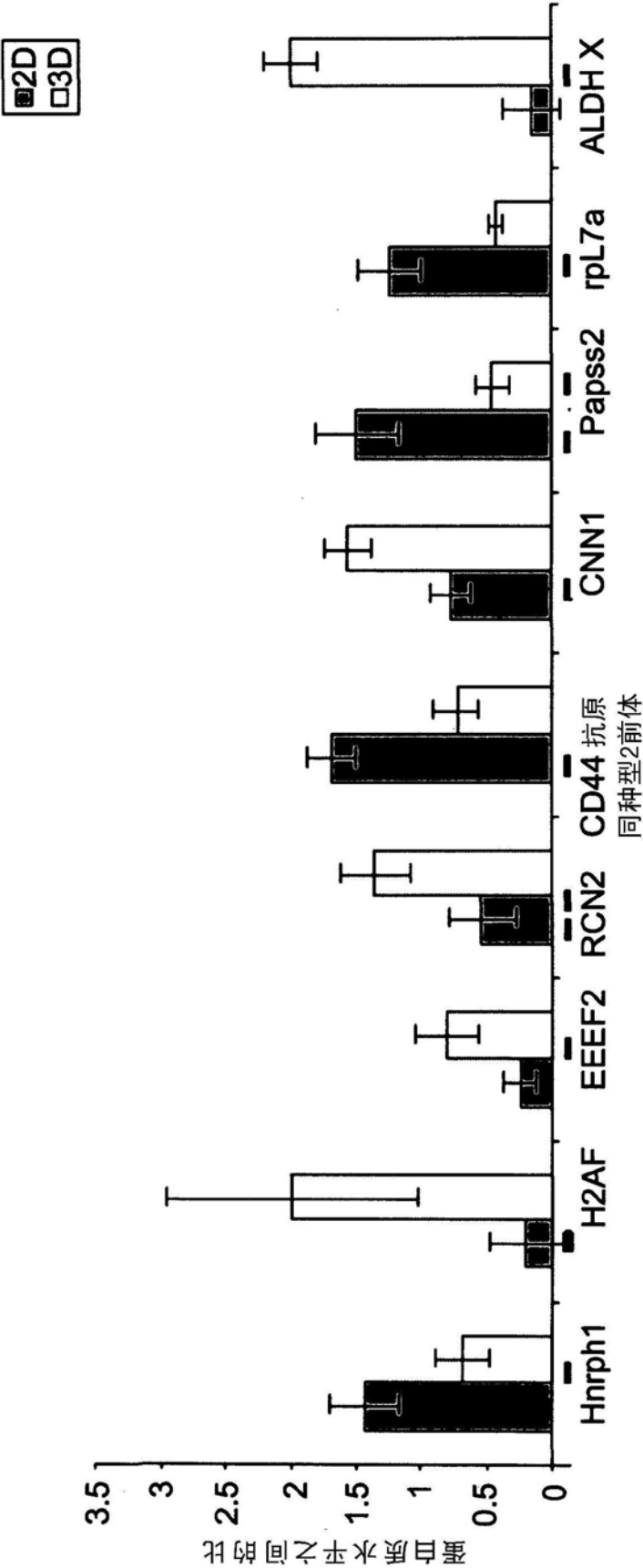


图4D



图5A



图5B



图5C



图5D

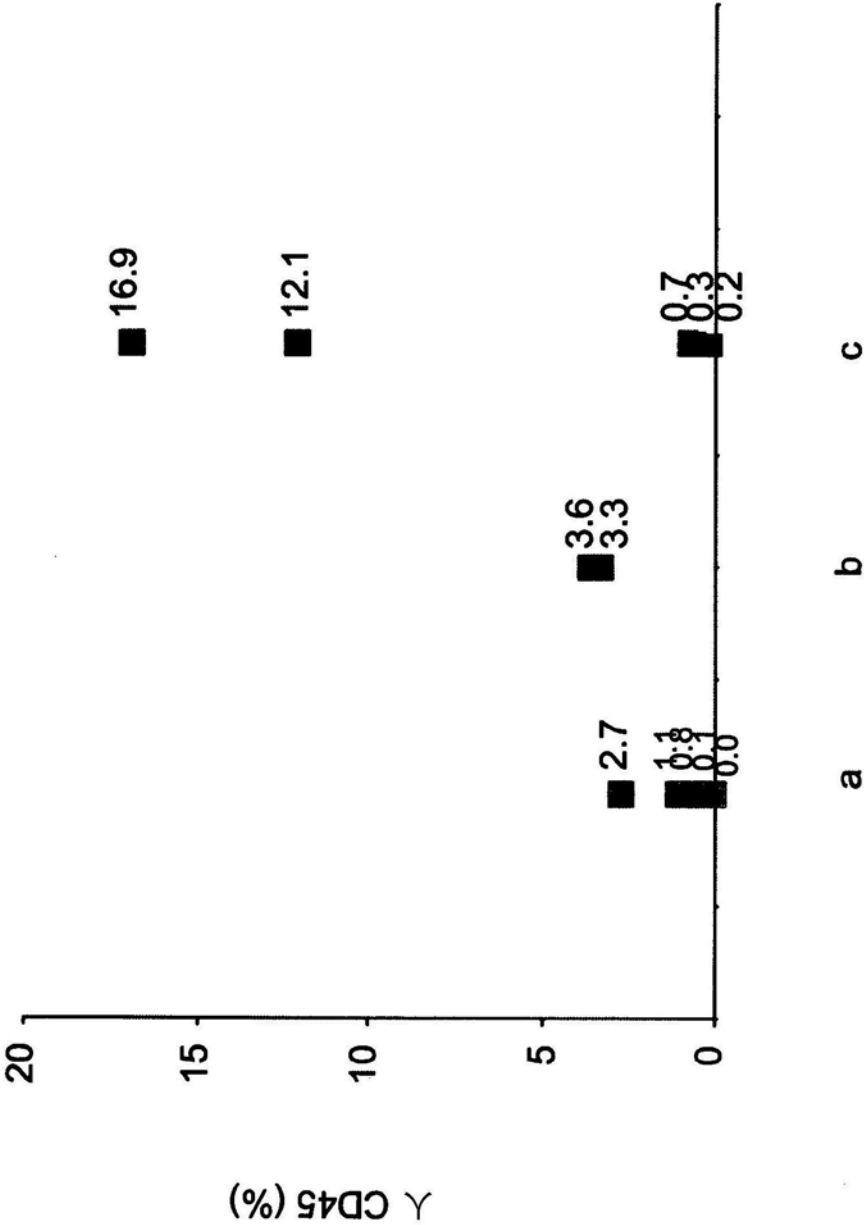


图9



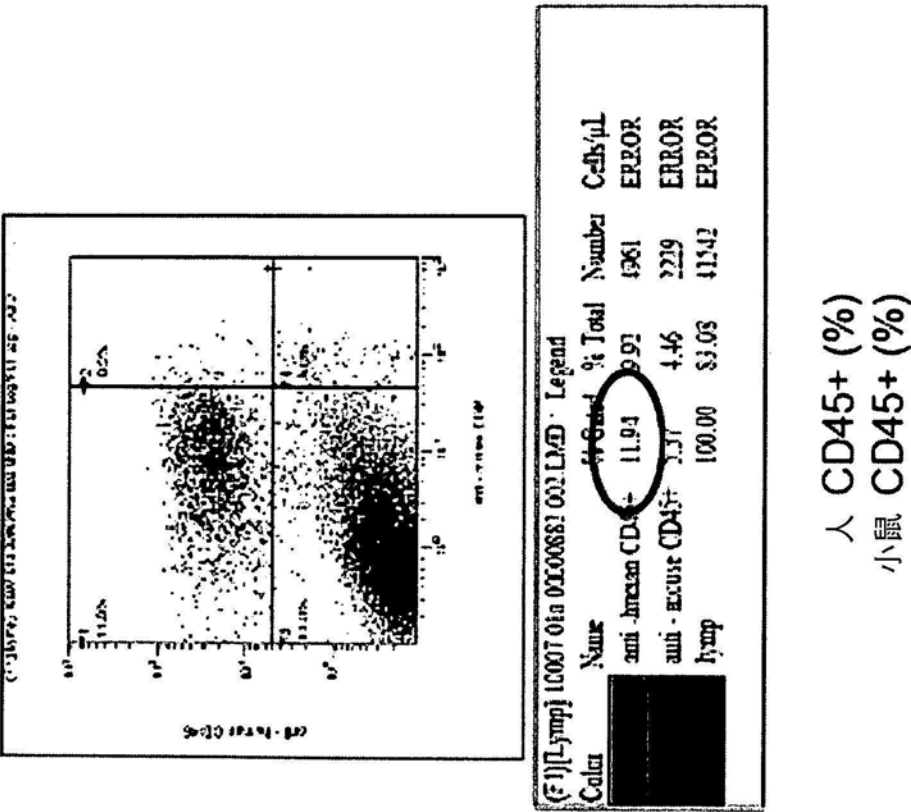


图7A

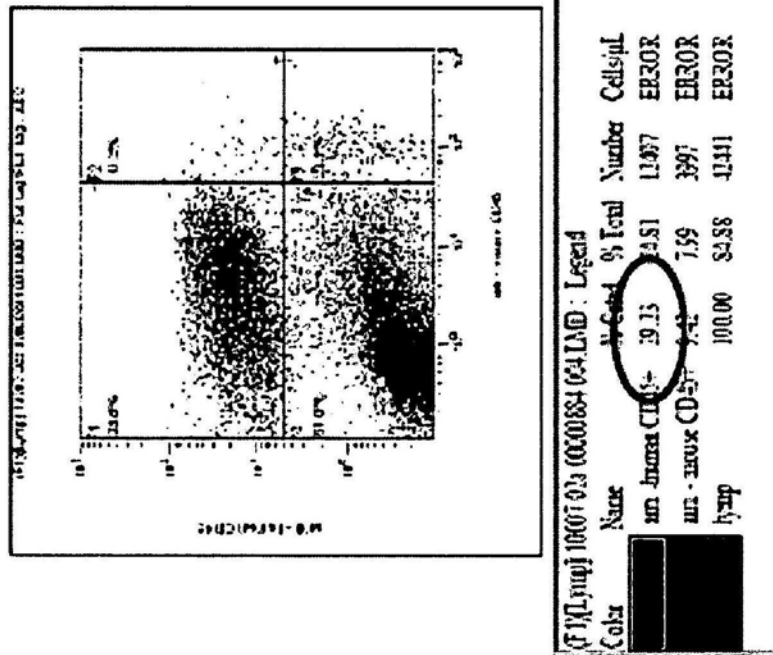


图7B

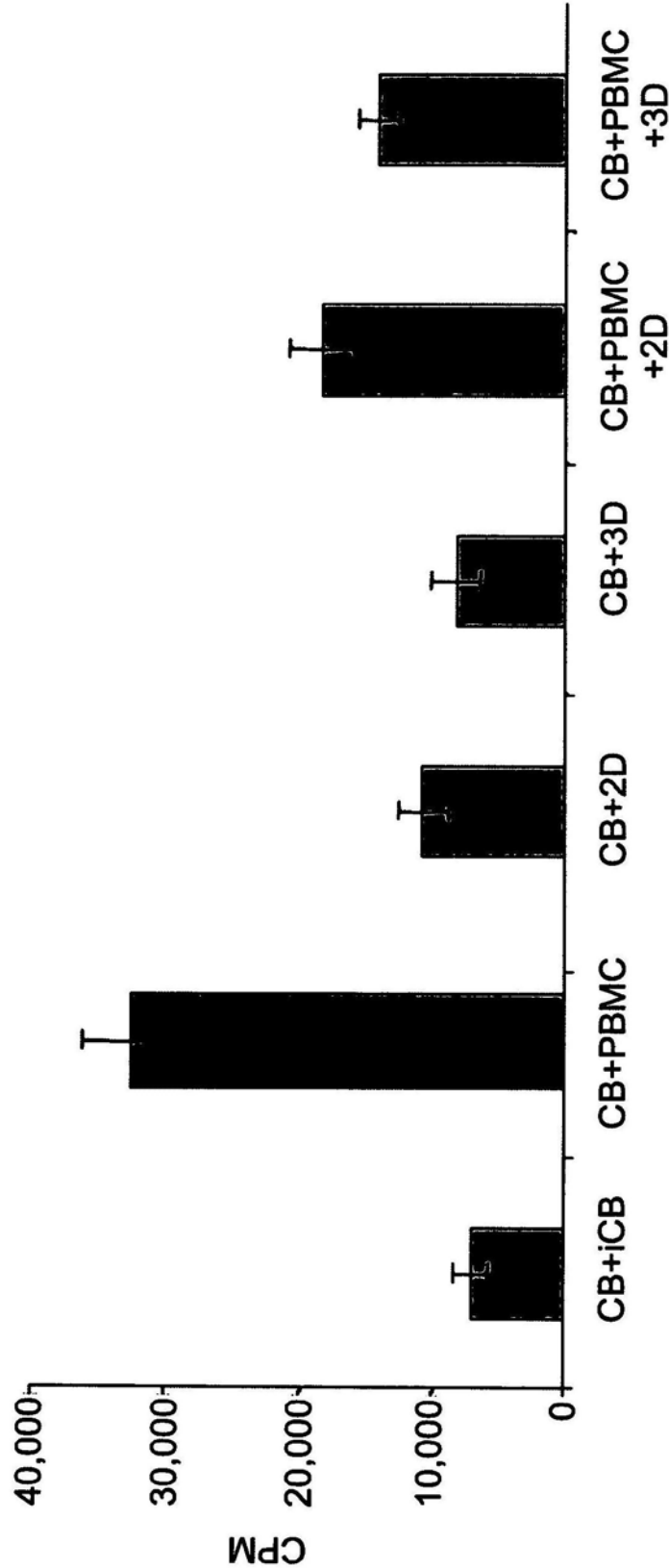


图8A

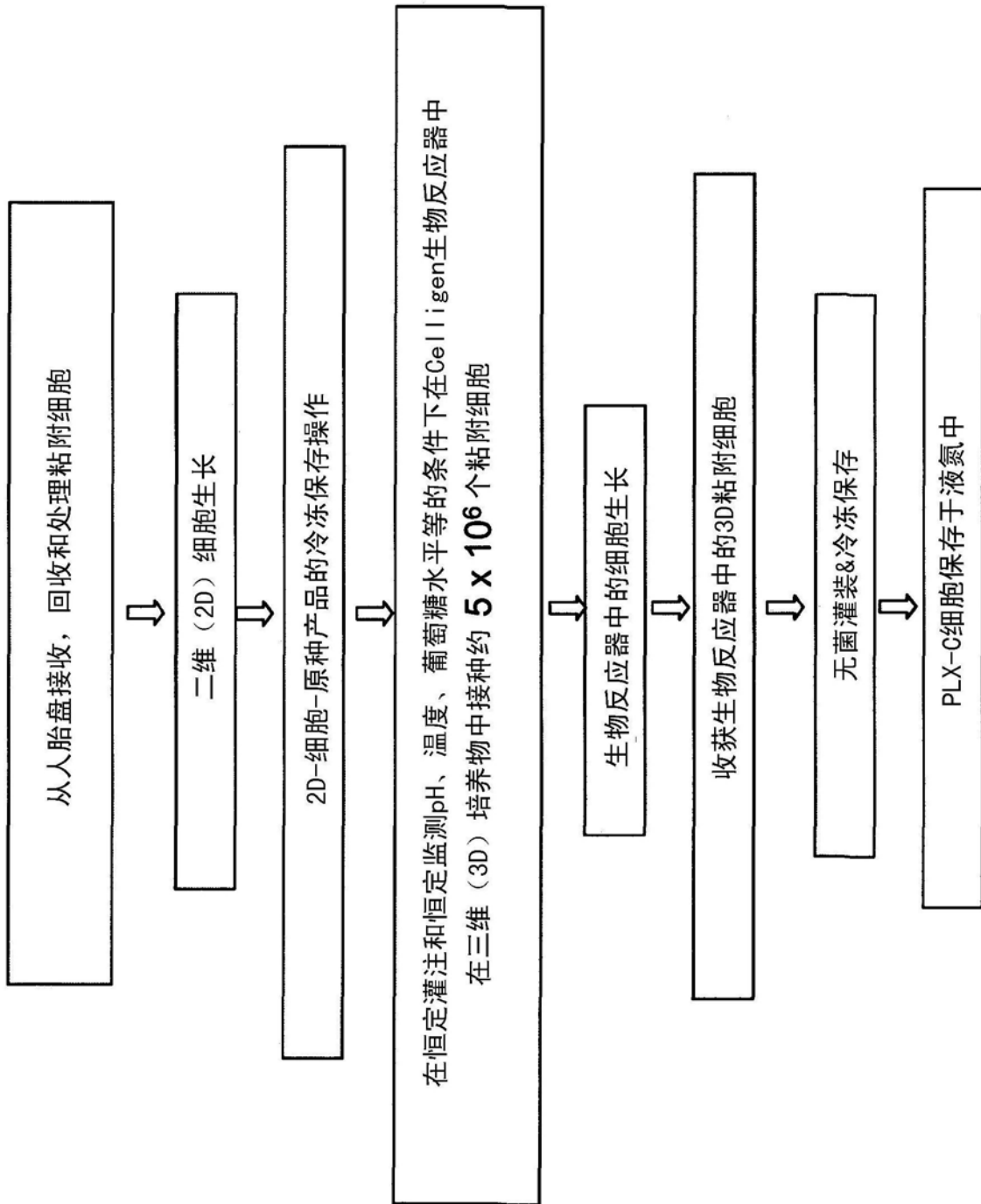


图8B

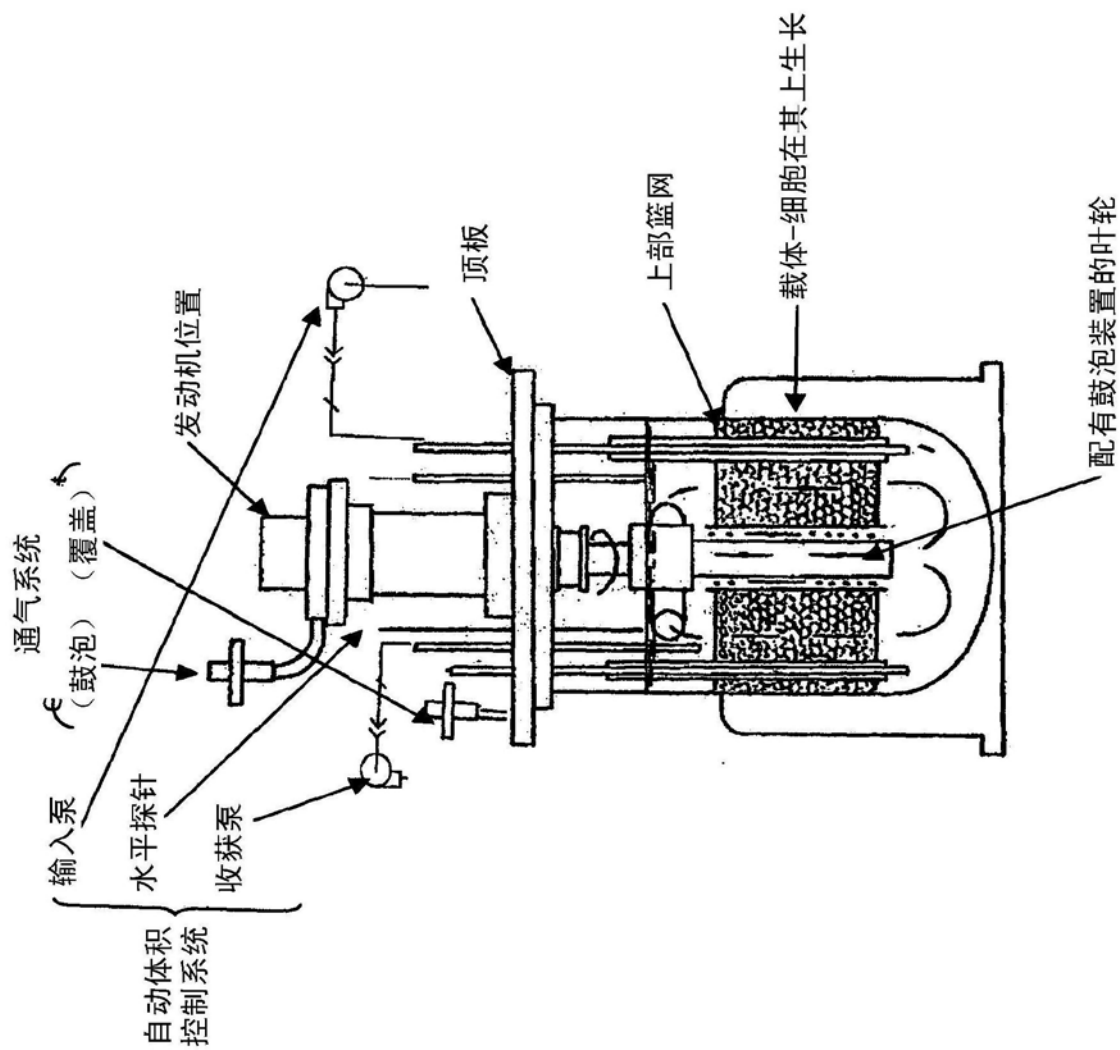
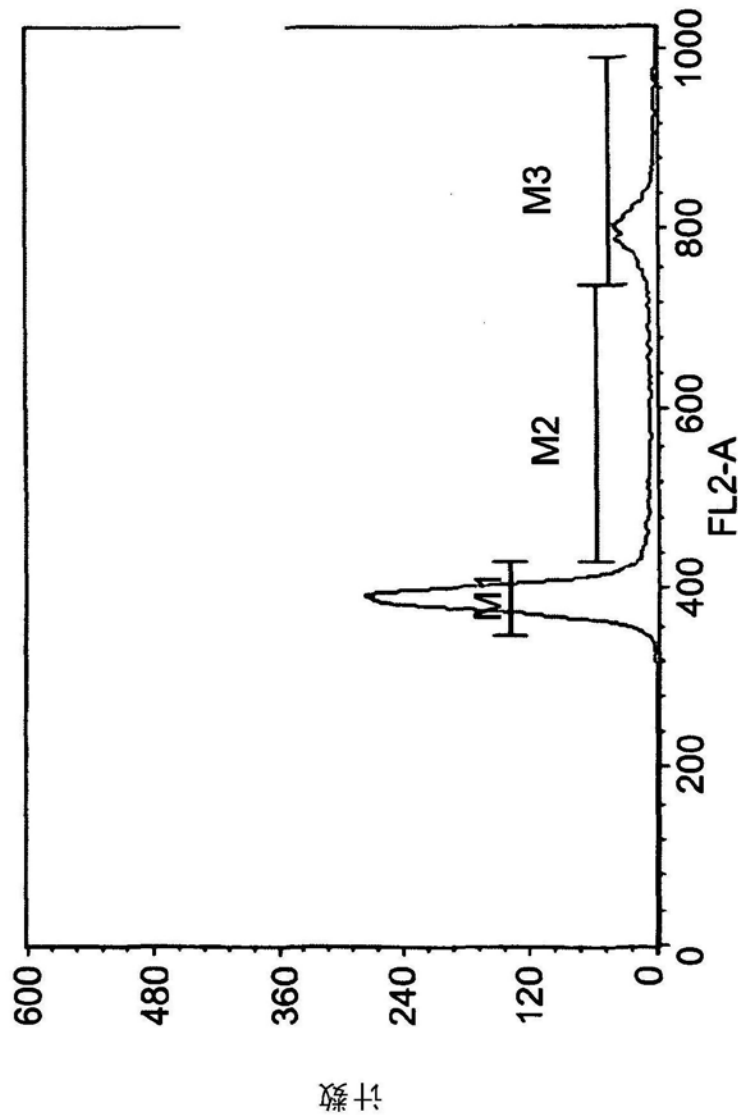


图8C



直方图统计  
数据单位对数: 线性值:

样品ID:  
患者姓名:  
门控事件: 13880  
X参数: FL2-A (线性)

患者ID:  
病例数:  
门: G1  
总事件: 15750

标记	左	右	事件	门控%	总	平均值	几何平均值	CV	中值	峰Ch
所有	0,	1023	13860	100.00	88.00	485.37	463.42	33.41	397.00	393
M1	347,	430	9447	68.16	59.98	388.49	388.23	3.71	389.00	393
M2	430,	738	1958	14.13	12.43	570.70	562.60	16.86	563.00	437
M3	738,	991	2422	17.47	15.38	798.57	797.80	4.46	796.00	797

图9A

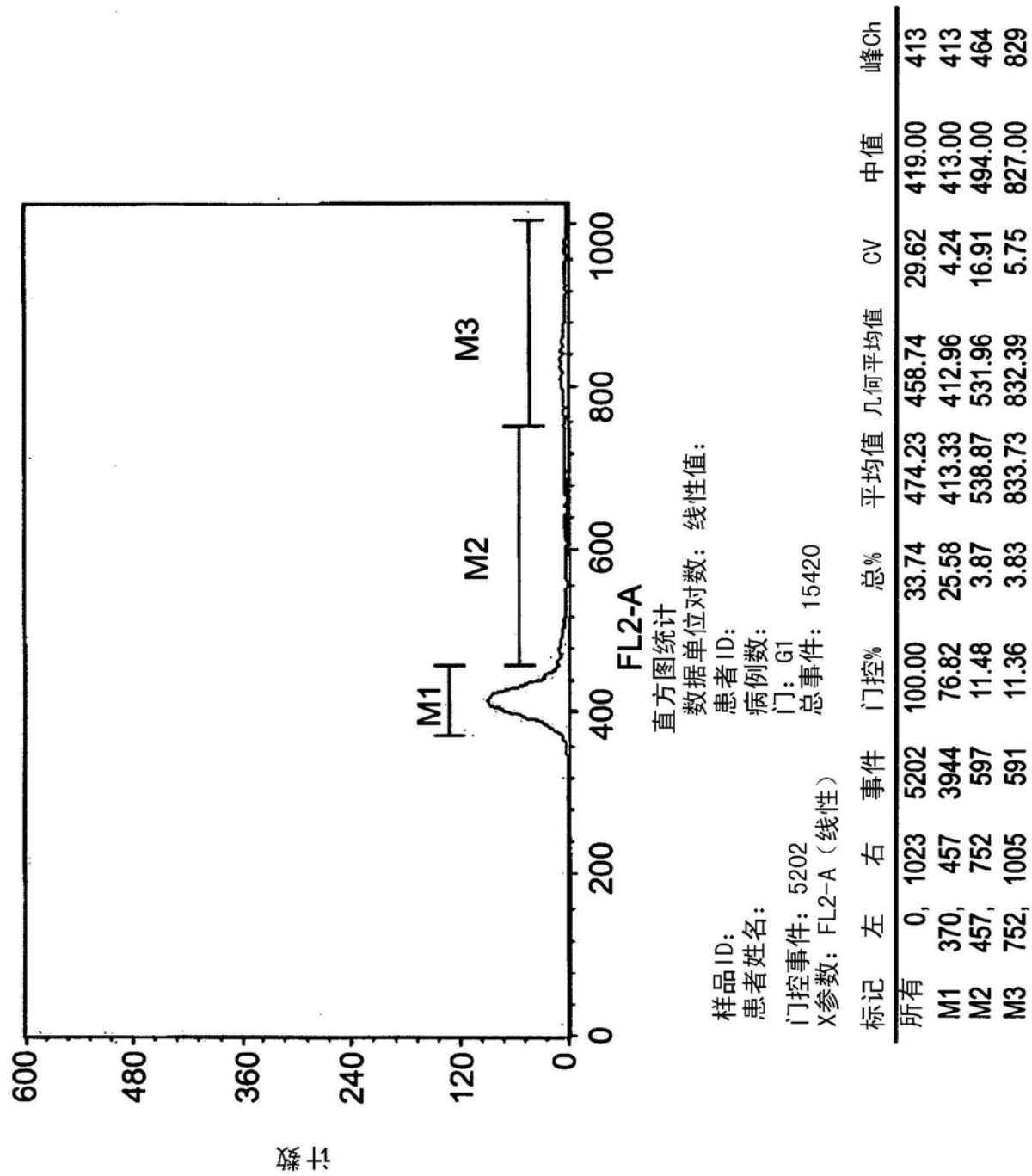


图9B

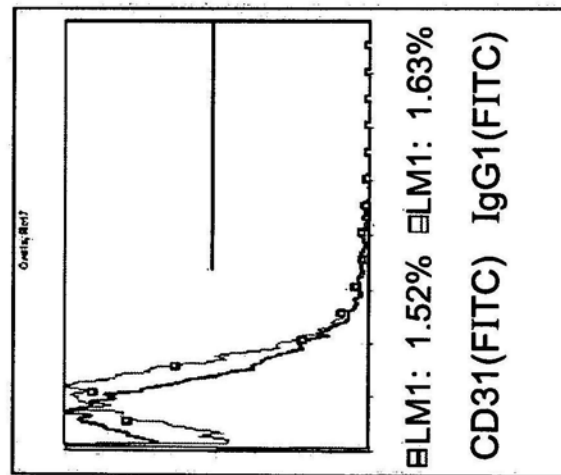


图10A

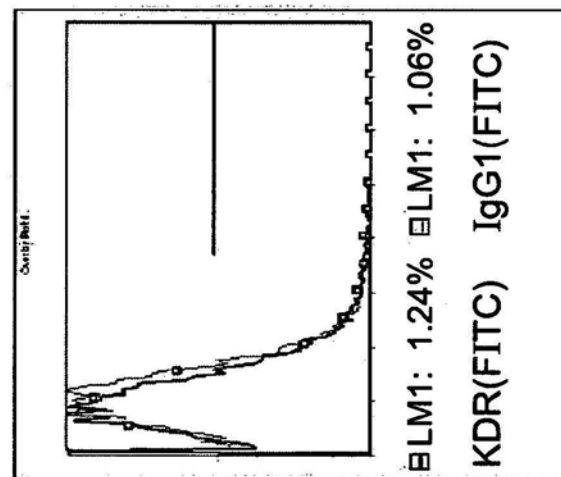


图10B



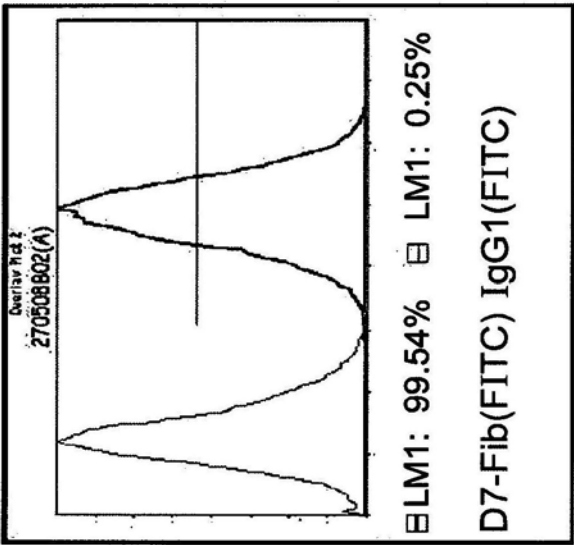


图10C

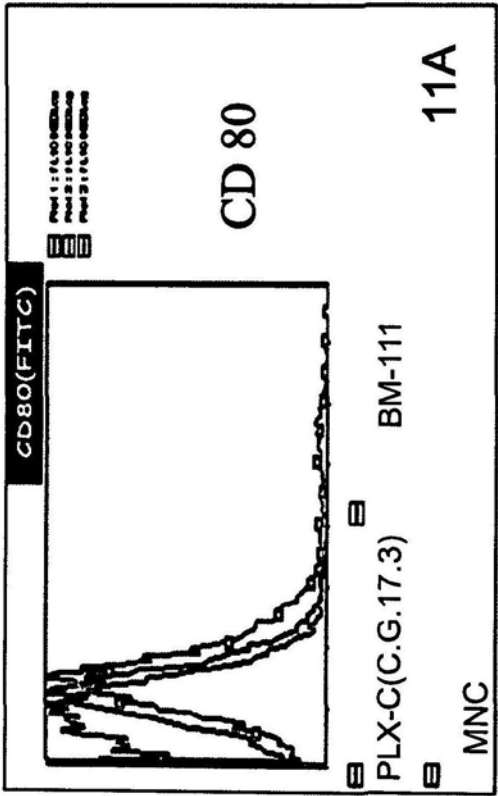


图11A

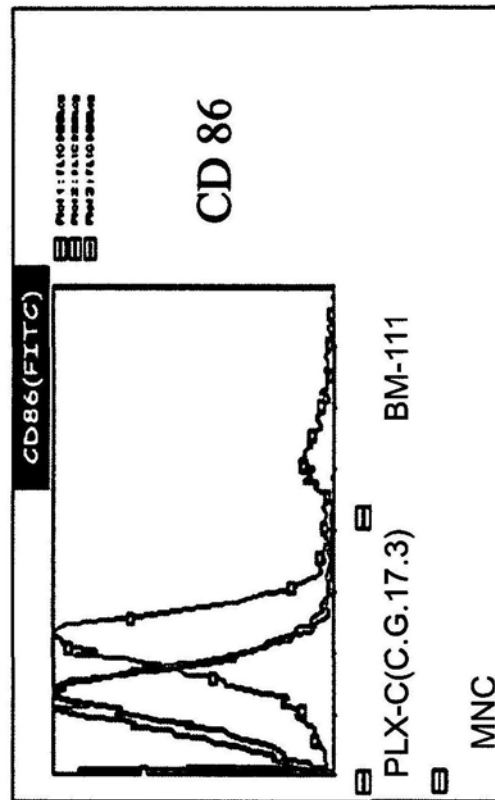


图11B

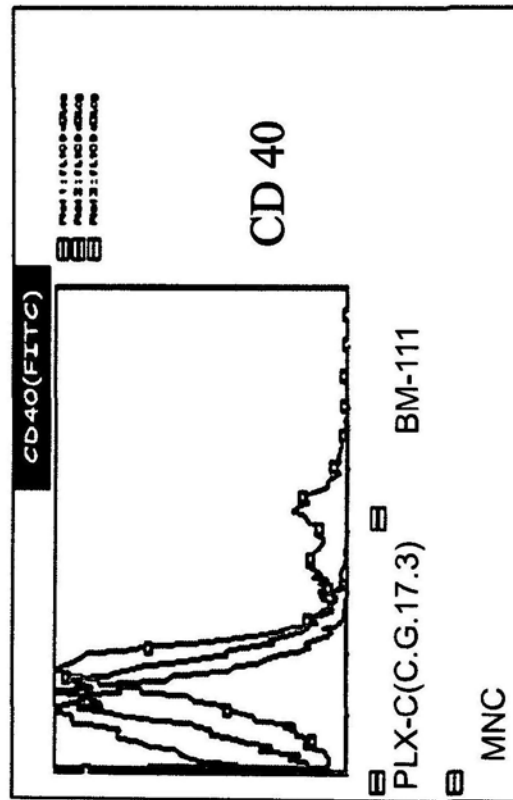


图11C

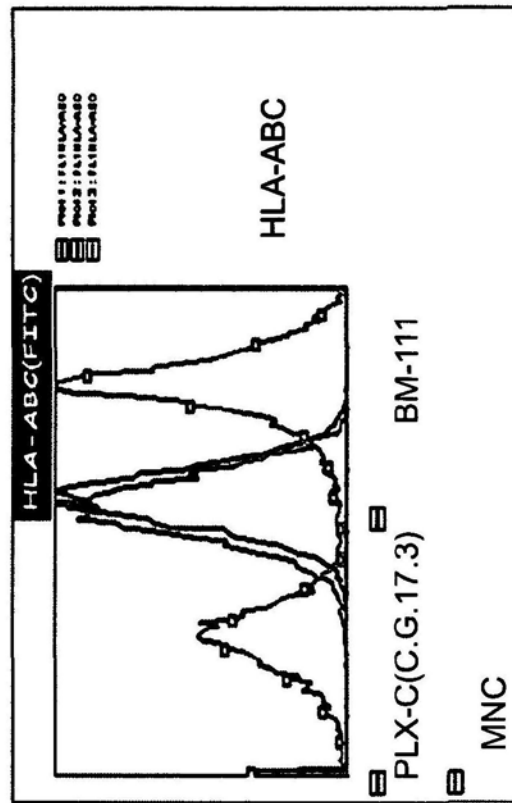
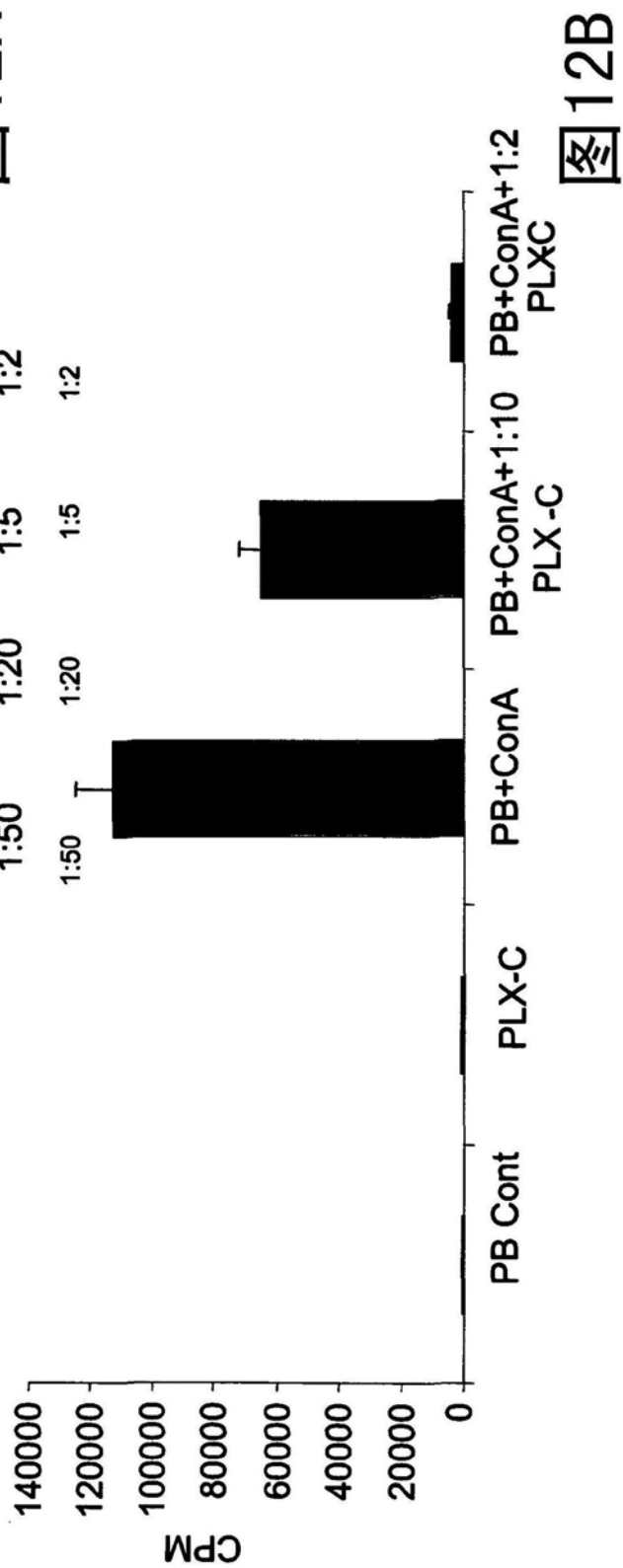
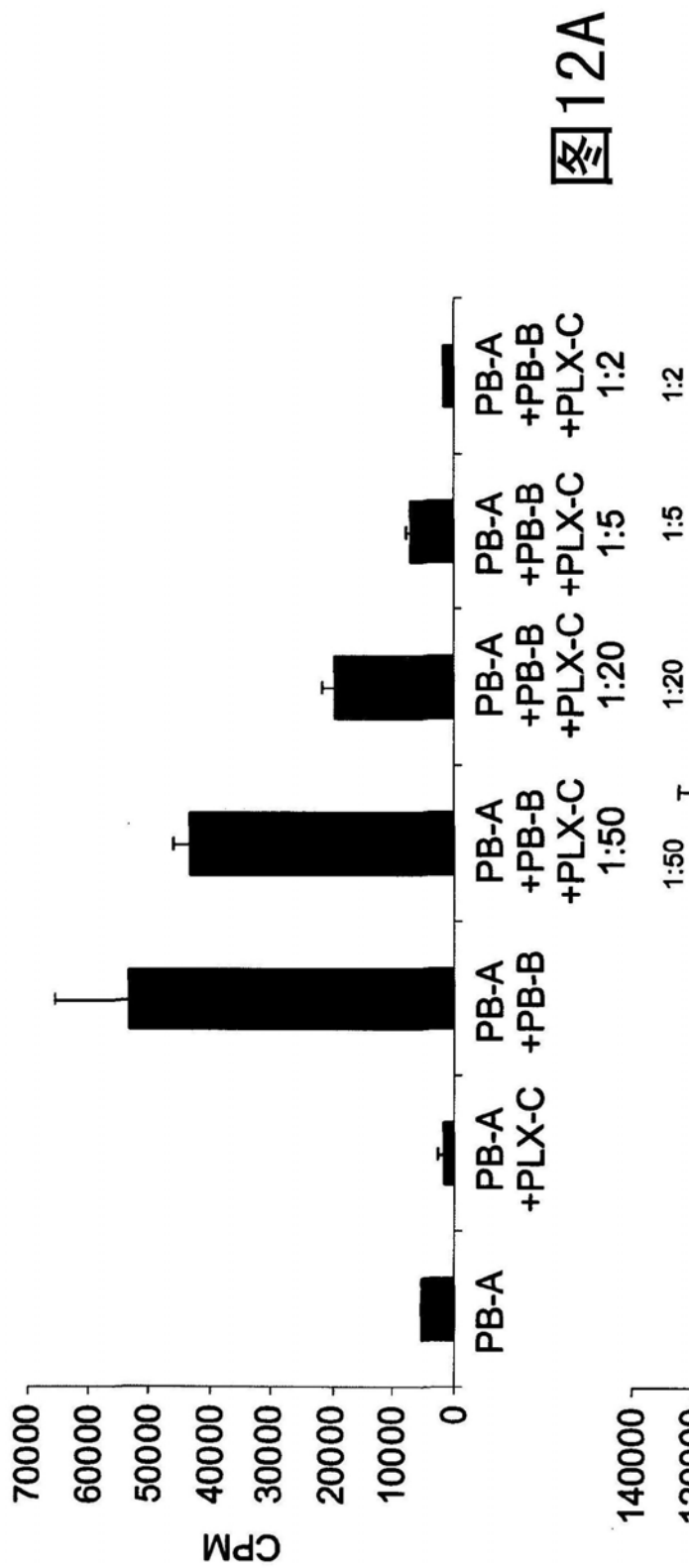


图11D



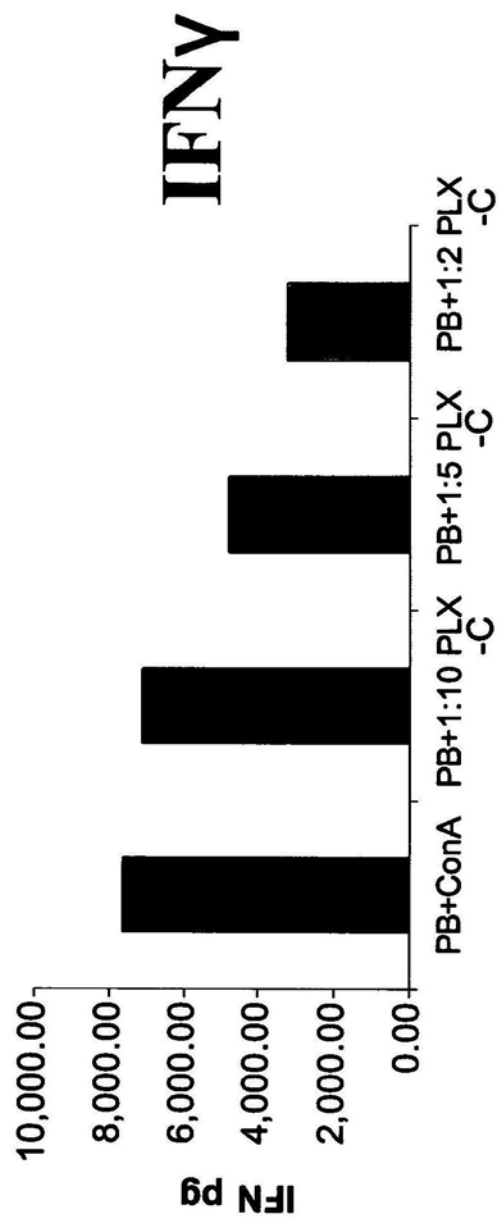


图13A

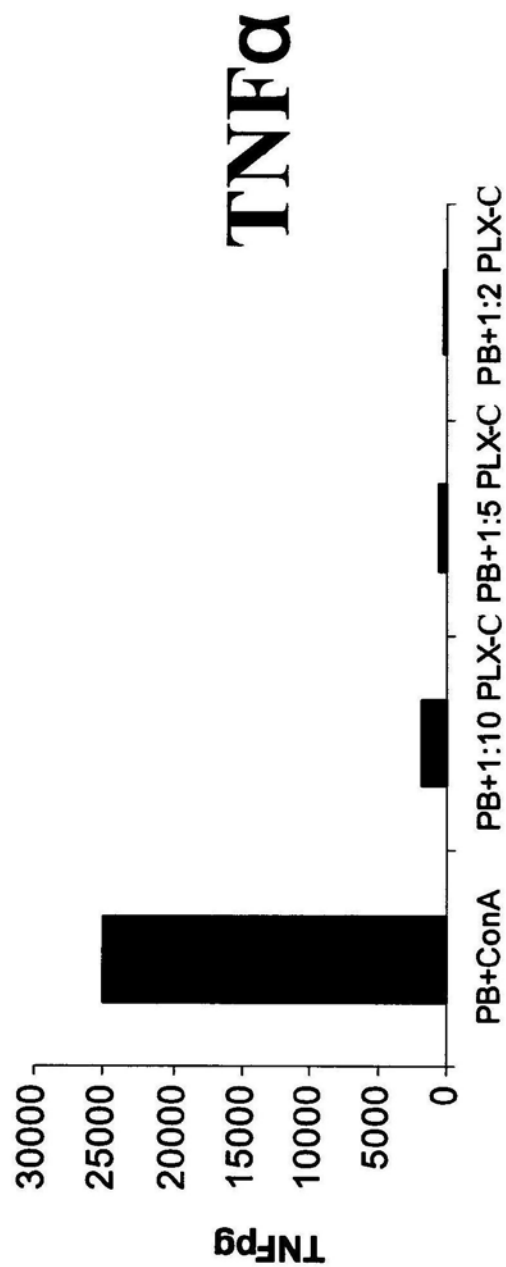


图13B

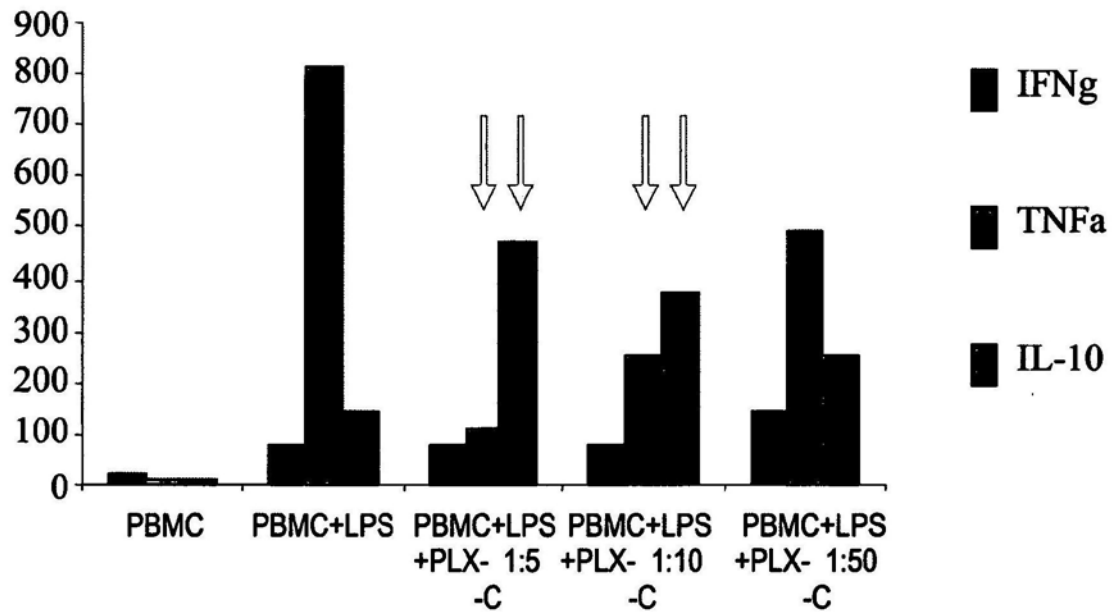


图13C

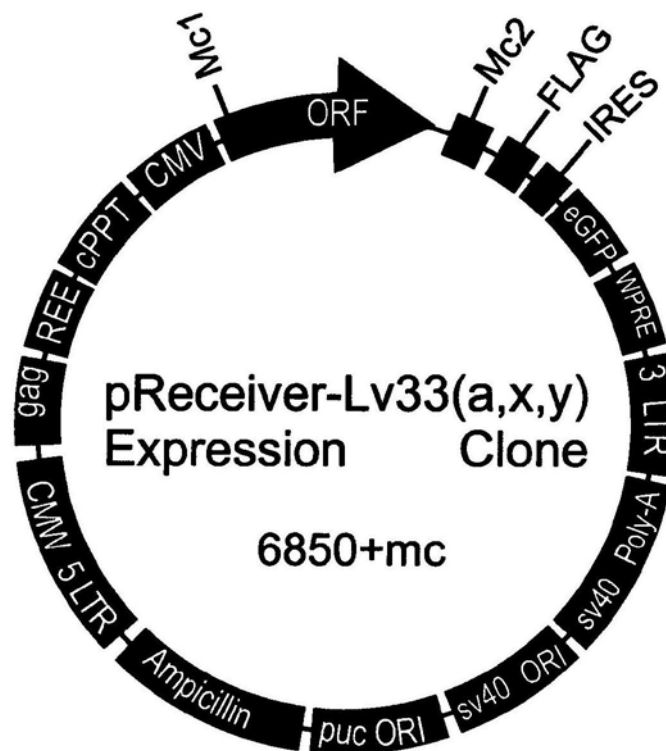


图14



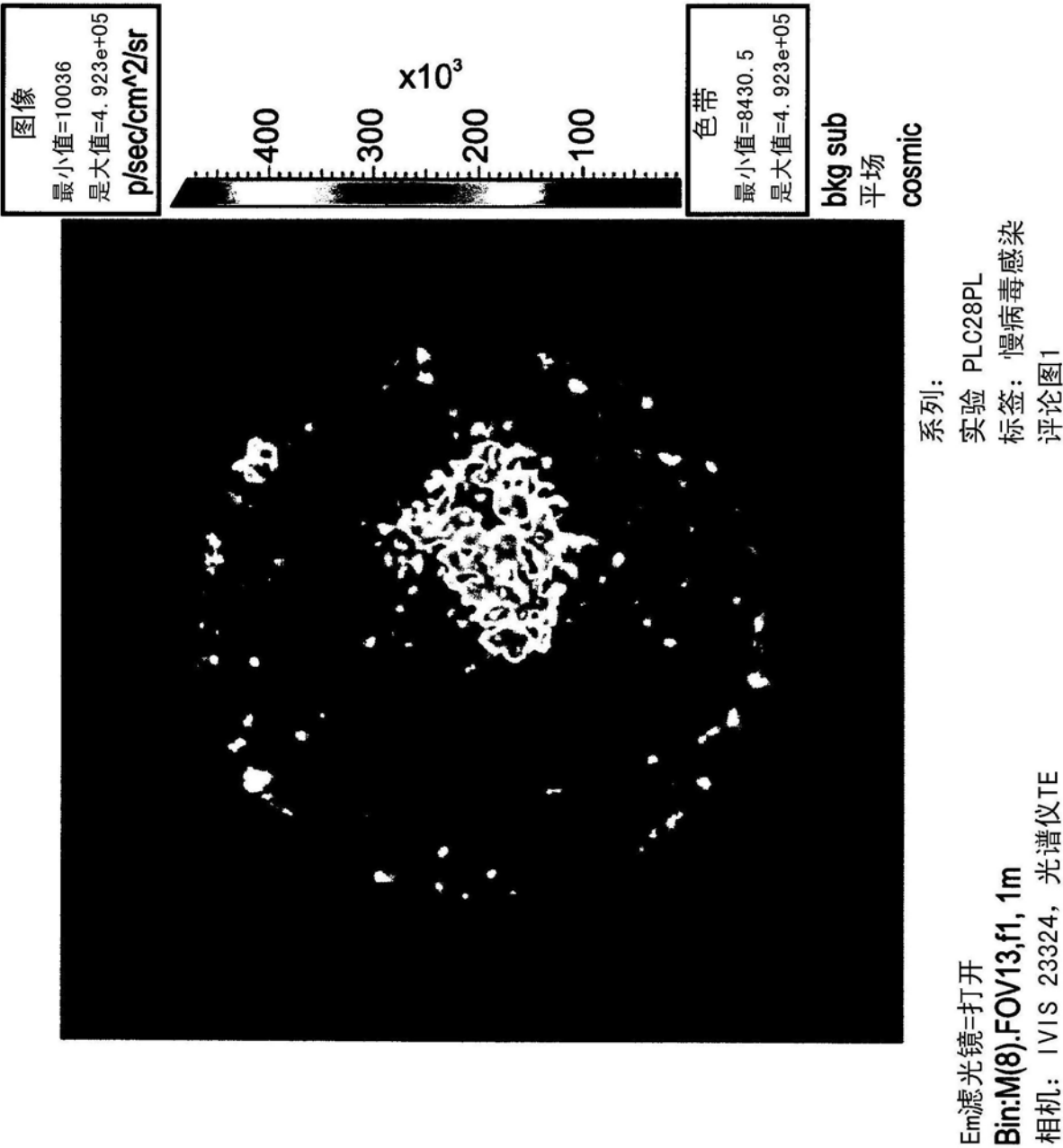


图15

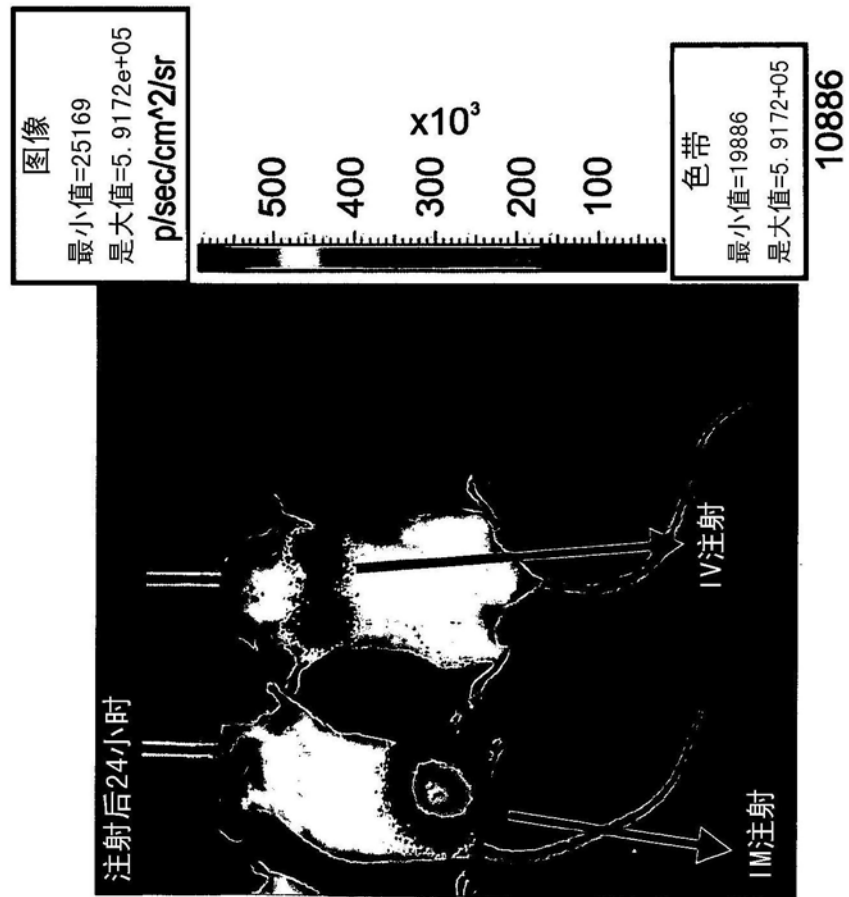


图16A

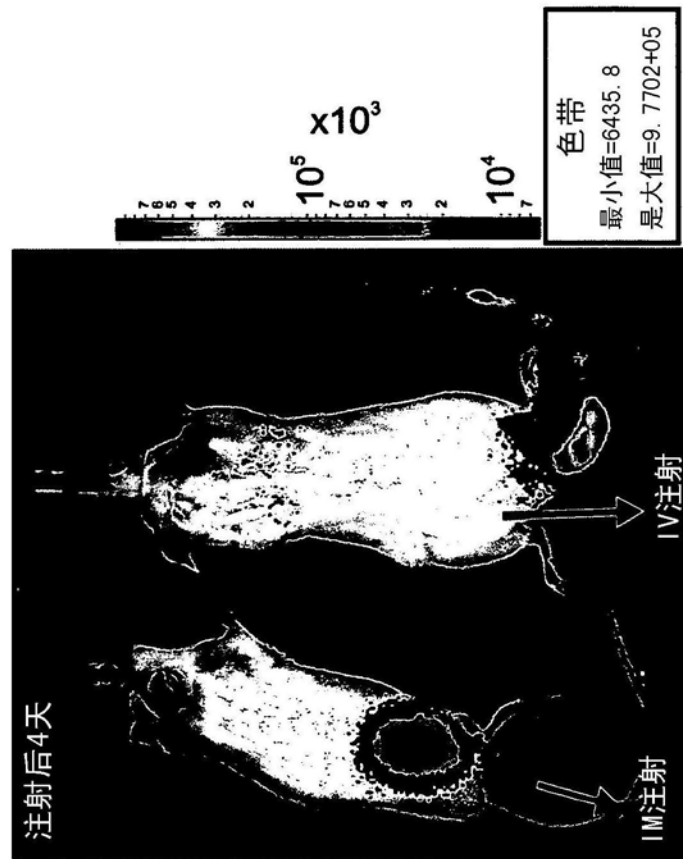


图16B

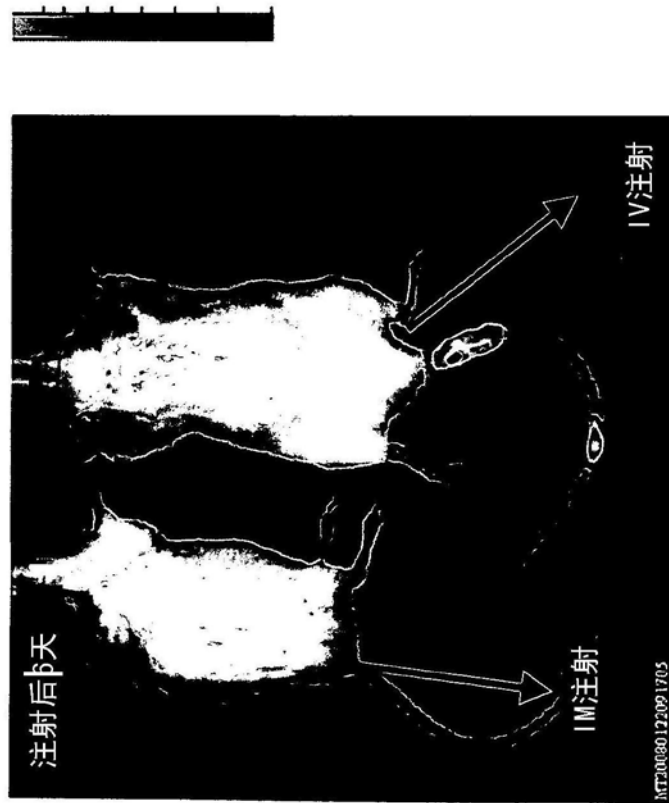


图16C

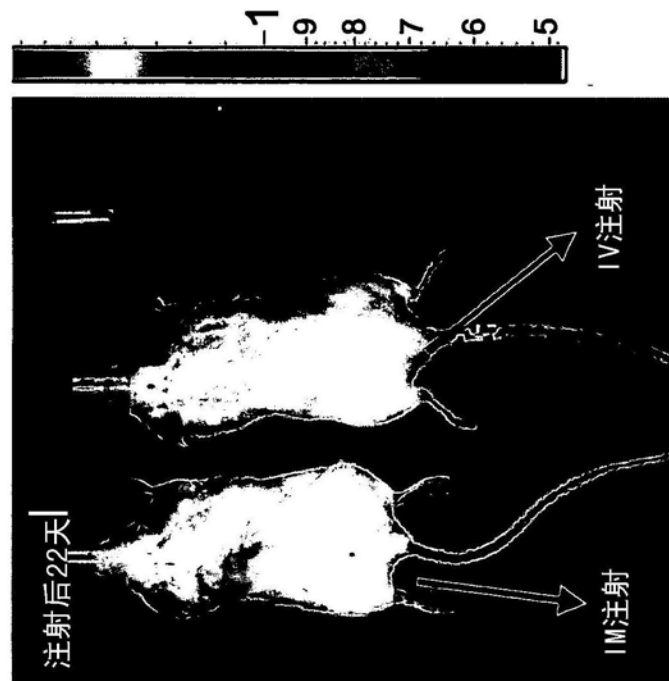


图16D

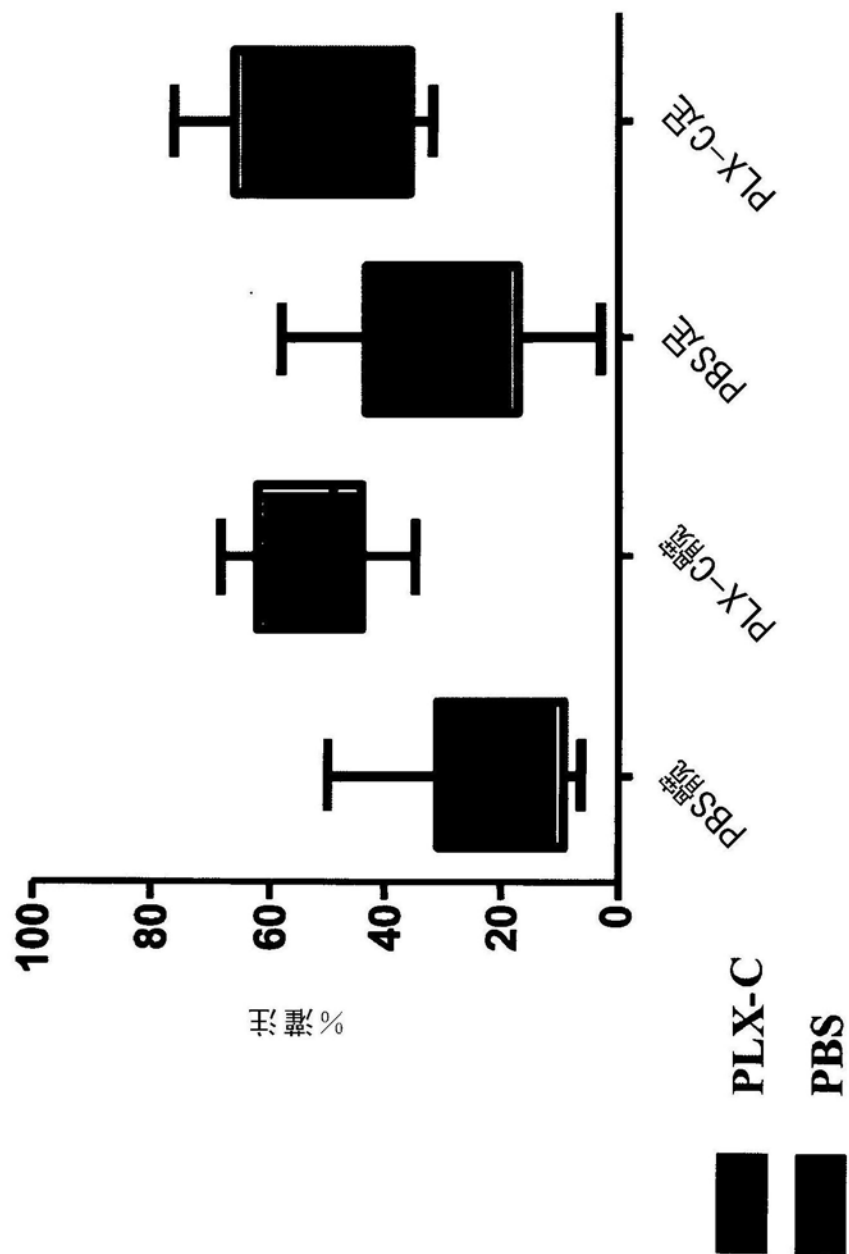


图17

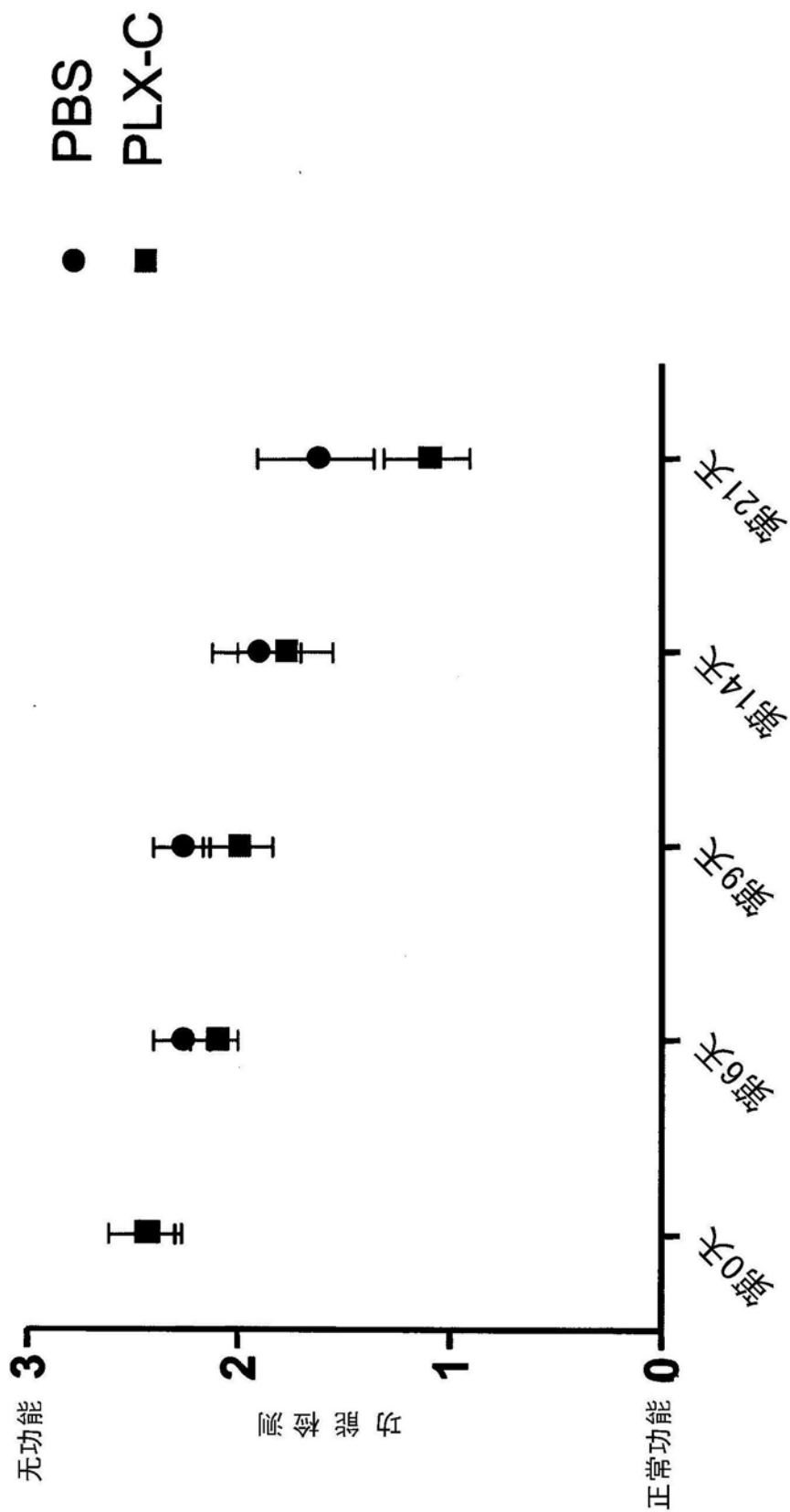
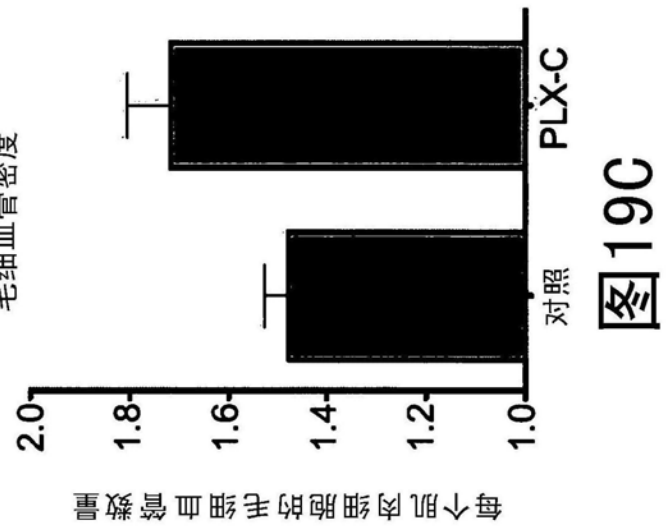
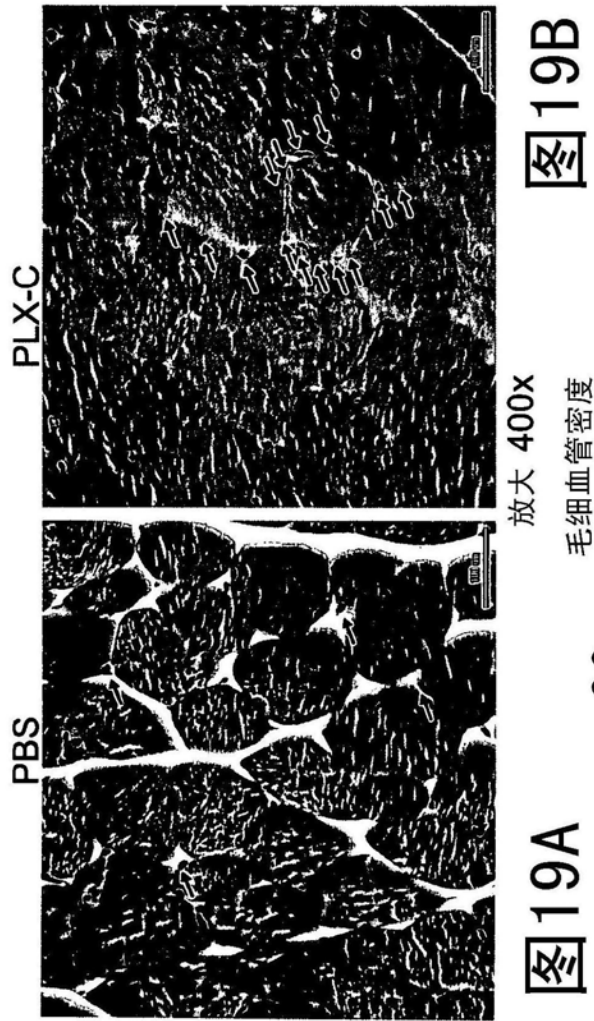


图18



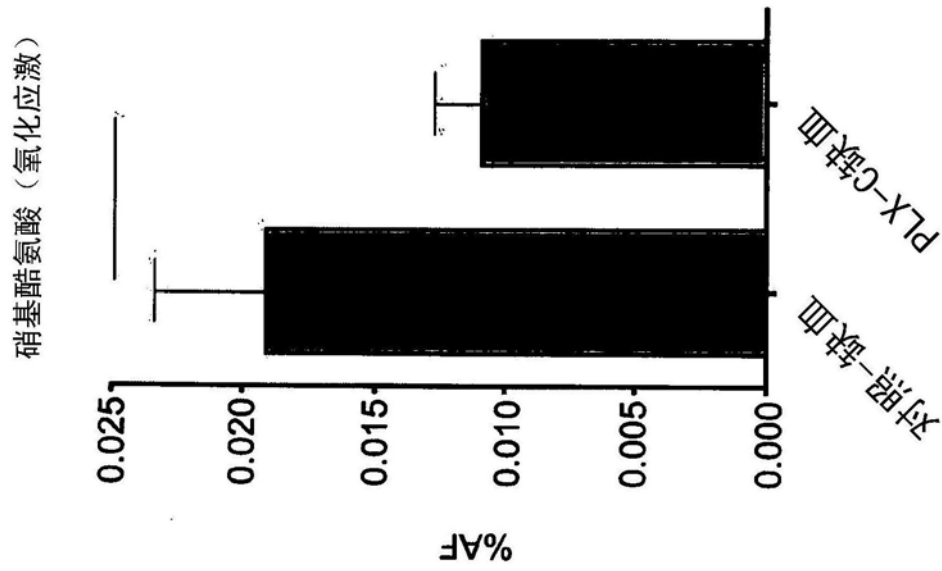


图20A

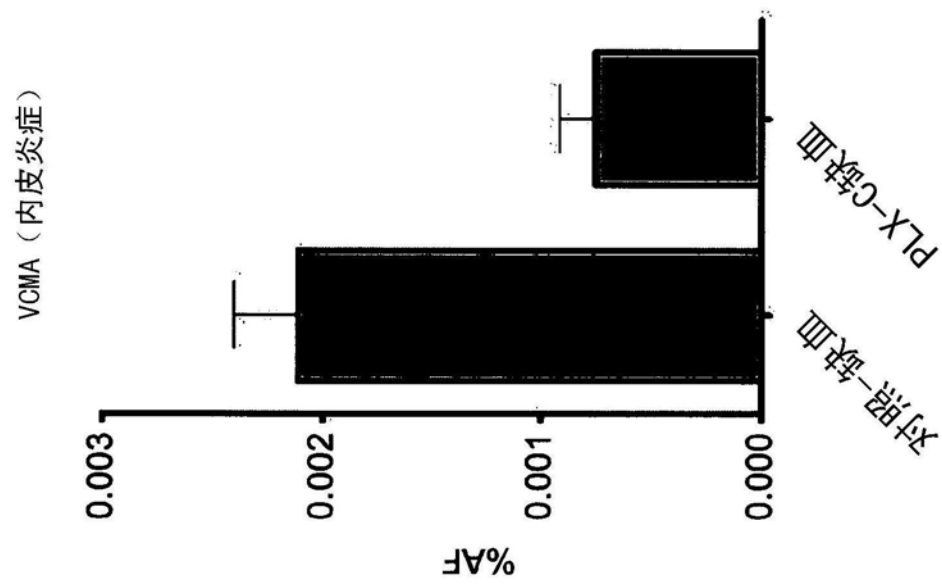


图20B