



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102333863 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 25

(21) 申请号 201080004509. 3

C12N 15/12 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 01. 13

A61K 35/12 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 25/16 (2006. 01)

61/144, 206 2009. 01. 13 US

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 37/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 07. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/020884 2010. 01. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02010/083203 EN 2010. 07. 22

(71) 申请人 干细胞生物科技公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 詹姆斯·王 阎云

(74) 专利代理机构 中国商标专利事务所有限公

司 11234

代理人 万学堂

(51) Int. Cl.

C12N 5/074 (2006. 01)

C12N 5/02 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 13 页

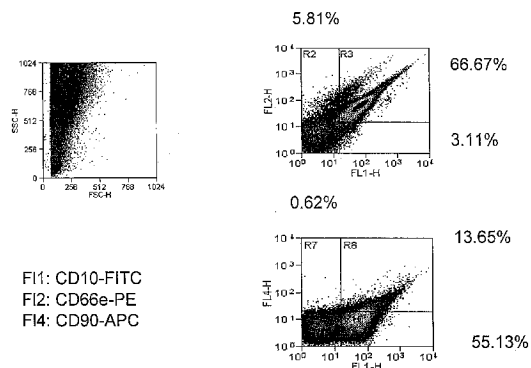
(54) 发明名称

非胚胎干细胞及其用途

(57) 摘要

本发明揭示了非胚胎来源的新颖干细胞及其用途。

从血浆区段(plasma fractions)中纯化胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)-(胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)数量 239×10^6 个细胞/毫升)



1. 一种制造多能性或全能性细胞群体的方法,其特征在于,包含:
取得复数个胚叶细胞-类似性干细胞(BLSCs),
在含有维生素 A 酸(RA)或转形生长因子 β (TGF- β) 的培养基中培养 BLSCs,以及
鉴定及富化经培养细胞中的多能性或全能性细胞;
其中该多能性或全能性细胞表达 GADPH 或 β -肌动蛋白的 mRNA。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该多能性或全能性细胞在尺寸上为 1 至 15 微米。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该培养基含有 0.1 至 20 μ M RA 且培养该 BLSCs 2 至 8 星期。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,该培养基含有 1 至 15 μ M RA 且培养该 BLSCs 2 至 8 星期。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,该培养基含有 5 至 12 μ M RA 且培养该 BLSCs 3 至 4 星期。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于,该多能性或全能性细胞在尺寸上为 1 至 15 微米且在悬浮液中形成片状构造。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该培养基含有 1 至 40nM TGF- β 且培养该 BLSCs 2 至 8 星期。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,该培养基含有 2 至 20nM TGF- β 且培养该 BLSCs 2 至 8 星期。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,该培养基含有 5 至 12nM TGF- β 且培养该 BLSCs 4 至 6 星期。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,该多能性或全能性细胞在尺寸上为 1 至 15 微米、具有圆形形状且形成凝聚物。
11. 一种组合物,其特征在于,包含复数个经培养的细胞,该经培养的细胞(1)为多能性或全能性,(2)在尺寸上为 1 至 15 微米,且(3)表达 GADPH 或 β -肌动蛋白的 mRNA。
12. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在于,该组合物进一步包含维生素 A 酸(RA)或转形生长因子 β (TGF- β)。
13. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在于,该细胞的第一群为 CD66e⁺。
14. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在于,该细胞包括重组核酸。
15. 如权利要求 14 所述的组合物,其特征在于,该重组核酸编码多肽且该细胞含有编码多肽的 mRNA。
16. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在于,该细胞通过如权利要求 1 所述的方法制备。
17. 如权利要求 16 所述的组合物,其特征在于,该细胞的第二群为 CD66e⁻。
18. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在于,该细胞不会表达 β_2 -微球蛋白基因。
19. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在于,该细胞不会表达一种或以上由第 I 类主要组织相容性复合体(MHC)基因所编码的蛋白质,该蛋白质会激发 T 淋巴球所媒介的抗细胞反应。
20. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在于,该细胞为 CD10⁺、CD90⁺、CD105⁺ 及

CXCR4⁺。

21. 如权利要求 11 所述的组合物,其特征在于,该细胞为台盼蓝 (trypan blue) 染色阴性。

22. 一种治疗患者退化性疾病的方法,其特征在于,该方法包含将有效量的如权利要求 11 所述的组合物投予需要该治疗的患者。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其特征在于,在该组合物中的各细胞包括重组核酸。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其特征在于,该重组核酸编码多肽且该细胞含有编码多肽的 mRNA。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,该退化疾病为糖尿病、神经退化性疾病、关节炎或癌症。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,该神经退化性疾病为帕金森氏症。

27. 一种治疗患者自体免疫性疾病的方法,其特征在于,该方法包含将有效量的如权利要求 11 所述的组合物投予需要该治疗的患者。

28. 一种鉴定用于治疗退化性疾病的候选药的方法,其特征在于,该方法包含:

使受试化合物与如权利要求 11 所述的组合物接触以及

测定在退化性疾病中被下调的多肽的表达量,

其中于存在该受试化合物下的表达量若高于不存在该受试化合物下的表达量,则表示该化合物为治疗该疾病的候选药。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其特征在于,该退化性疾病为糖尿病、神经退化性疾病、关节炎、癌症或自体免疫性疾病。

30. 一种在患者中引进异源性核酸的方法,其特征在于,包含:

取得如权利要求 11 所述的组合物,其中该组合物中的细胞包括异源性核酸,以及将该细胞投予至需要该异源性核酸的患者。

31. 如权利要求 30 所述的方法,其特征在于,该异源性核酸编码多肽。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,该细胞在该患者中表达该多肽。

33. 一种细胞银行,其特征在于,包含复数种如权利要求 11 所述的组合物。

34. 如权利要求 33 所述的细胞银行,其特征在于,该细胞为人类细胞。

35. 一种制造如权利要求 33 所述的细胞银行的方法,其特征在于,包含:

从复数个患者收获细胞以分别得到复数个胚叶细胞-类似性干细胞群;

鉴定该细胞群,对于各细胞群得到至少一种预定的特征;以及

按照该至少一种预定的特征将该细胞群的各个分类。

36. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,该方法进一步包含扩增细胞群。

非胚胎干细胞及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求 2009 年 1 月 13 日递交的美国第 61/144,206 号专利申请的优先权。该申请的全部内容纳入本发明作为参考。

背景技术

[0002] 全能性干细胞,诸如胚胎干细胞 (ES cells),可在活体中分化成所有细胞系,而且,当被引进试管中时,可分化成大部分细胞类型。ES 细胞衍生自早期哺乳动物胚胎。由于其全能性,威信其在治疗退化性或遗传疾病上具有大的潜力。不过,在伦理及供给方面的考量阻碍人类 ES 细胞在研究及治疗上的使用。非胚胎来源的全能性或多能性干细胞(例如来自成年或年轻动物的组织)将可回避此阻碍。虽然一些干细胞已从这些非胚胎来源得到,这些细胞中的一些具有有限的发育潜能。又,在供给方面,这些细胞难以获得且这些细胞的量太有限以致不符有意义的临床或研究用途需要。再者,这些细胞的一些在活体中会发育成畸胎瘤,所以不适合活体使用。因此需要较安全、容易获得且具有丰富来源的非胚胎全能性或多能性干细胞。

发明内容

[0003] 本发明至少部分是基于非可预期地发现从非胚胎来源制备的干细胞群为全能性或多能性,可以极高产率得到,且在活体中不会发育成畸胎瘤。

[0004] 所以,本发明的一方面的特征为制造多能性或全能性干细胞群的方法。该方法包括:取得复数个胚叶细胞-类似性干细胞 (BLSCs, blastomere-like stem cells),在含有维生素 A 酸 (RA, retinoic acid) 或转形生长因子 β (TGF- β , transforming growth factor beta) 的培养基中培养 BLSCs,以及鉴定及富化经培养细胞中的多能性或全能性细胞。该等多能性或全能性细胞表现 GADPH 或 β -肌动蛋白的 mRNA。换言之, GADPH 或 β -肌动蛋白的 mRNA 的量是以下节实施例所述的方式通过 RT-PCR 测定法检测。

[0005] 该多能性或全能性干细胞在尺寸上通常为 1 至 15 微米,较佳在尺寸上为 1 至 10 微米,且更佳在尺寸上为 1 至 5 微米。这些尺寸为在悬浮液中或附接的细胞的尺寸(亦即,悬浮的细胞或附接的细胞)。

[0006] 该术语“干细胞”是指能分化成许多最终、经分化细胞类型的细胞。干细胞可为全能性或多能性。全能性干细胞典型地具有发育成任何细胞类型的能力。全能性干细胞在来源上可为胚胎及非胚胎二者。多能性细胞典型地为能分化成数种不同的最终分化细胞类型的细胞。单能干细胞只能产生一种细胞类型,但具有自我更新的性质而使其能与非干细胞区分。这些干细胞源自各种组织或器官系统,其包括,但非限于,血液、神经、肌肉、皮肤、肠道、骨骼、肾脏、肝脏、胰脏、胸腺等。根据本发明,干细胞衍生自成人或新生儿组织或器官。BLSC(将于下文中详述)为在成年或年轻动物中的一群非胚胎干细胞。这些细胞为全能性且具有与胚胎干细胞相似的分化能力。参见 W02007/100845。

[0007] 将通过在含 RA 的培养基中培养 BLSCs 所得到的细胞中命名为 SBR。在一具体实施例中,该培养基含有 0.1 至 20 μ M RA 且可培养该 BLSCs 共计 2 至 8 星期。在另一具体实施

例中,该培养基含有 1 至 15 μM RA 且培养该等 BLSCs 2 至 8 星期。在又一具体实施例中,该培养基含有 5 至 12 μM RA 且培养该等 BLSCs 3 至 4 星期。如此制备的多能性或全能性 SBR 细胞在尺寸上为 1 至 15 微米(诸如 1 至 10、1 至 5、2 至 5、或 3 至 5 微米)且在悬浮液中可形成片状结构。

[0008] 将通过在含有 TGF- β 的培养基中培养 BLSCs 所得到的细胞命名为 SBT。在一具体实施例中,该培养基含有 1 至 40nM TGF- β 且培养该等 BLSCs 2 至 8 星期。在另一具体实施例中,该培养基含有 2 至 20nM TGF- β 且培养该等 BLSCs 2 至 8 星期。在又一具体实施例中,该培养基含有 5 至 12nM TGF- β 且培养该等 BLSCs 4 至 6 星期。该等多能性或全能性 SBT 细胞在尺寸上为 1 至 15 微米(诸如 1 至 10、1 至 5、2 至 5、或 3 至 5 微米)、具有圆形形状且可形成凝聚物。

[0009] 本发明的另一方面的特征为组合物,其含有复数个上文提及的经培养细胞,其(1)为多能性或全能性,(2)在尺寸上为 1 至 15 微米,(3)且表现 GADPH 或 β -肌动蛋白的 mRNA。该细胞可通过上述方法制备。该组合物可进一步含有 RA 或 TGF- β 。在一具体实施例中,该等细胞为 CD10⁺、CD90⁺、CD105⁺ 及 CXCR4⁺。在另一具体实施例中,该等细胞为台盼蓝染色阴性。亦即这些细胞展现台盼蓝排除。在再一具体实施例中,该等经培养的细胞含有为 CD66e⁺ 的第一群细胞以及为 CD66e⁻ 的第二群细胞。

[0010] 该等细胞实质上为纯。术语“实质上为纯”,当用于描述干细胞或衍生自干细胞的细胞(例如经分化的细胞)时,意指特定细胞构成制剂中的大部分细胞(亦即,超过 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%)。一般而言,经实质纯化的细胞群构成制剂中的至少约 70%的细胞,通常制剂中的约 80%的细胞,尤其是制剂中至少约 90%的细胞(例如 95%、97%、99%或 100%)。如此,本发明的方法提供下述优点:在未被其他细胞类型污染下可得到实质纯的特定类型细胞群(例如 SBR 或 SBT 细胞)。

[0011] 上述经培养细胞可用于表现外源性重组多肽。因此,这些经培养的细胞在本发明的范围内,其各包括重组核酸。该重组核酸可编码多肽且该细胞可含有编码多肽的 mRNA。

[0012] 上述经培养的细胞可以遗传方法处理以致其不会表现 β 2-微球蛋白基因或不会表现一种或以上由第 I 类主要组织相容性复合体(MHC, major histocompatibility complex)基因所编码的蛋白质,该蛋白质会激发 T 淋巴球所媒介的抗细胞反应。既然这些细胞不会导致移植片的宿主排斥,因此可作为全适型供给细胞。

[0013] 一方面,本发明的特征为治疗患者退化性疾病的方法。该方法包括将有效量的上述组合物投予至需要该治疗的患者,该组合物含有一种或以上的上述多能性或全能性细胞。在一具体实施例中,这些细胞的至少一个包括重组核酸。该重组核酸可编码多肽且该细胞可含有编码多肽的 mRNA。退化性疾病的例子包括糖尿病、神经变性疾病、关节炎及癌症。神经变性疾病的例子包括帕金森氏症。

[0014] 另一方面,本发明的特征为治疗患者自体免疫性疾病的方法。该方法包括将有效量的上述组合物投予至需要该治疗的患者。

[0015] 待治疗上述失调之一的患者可由针对特定失调的标准诊断技术鉴定。“治疗”是指将组合物(例如细胞组合物)投予至罹患该失调或有发展成该失调的危险的患者,其目的为对于该失调、该失调的症状、继发于该失调的疾病状态或倾向损伤/失调的体质加以治愈、减轻、解除、治疗,延迟其发生,预防或缓解。“有效量”是指能在被治疗患者中产生医疗

上期望结果的组合物的量。该治疗方法可单独进行或与其他药物或疗法并行。

[0016] 又一方面,本发明的特征为鉴定用于治疗退化性疾病的候选药。该方法包括:使受试化合物与上述组合物或细胞接触以及测定在退化性疾病中被下调的多肽的表现量的步骤。于存在受试化合物下的表现量若高于未存在受试化合物下的表现量,则表示该化合物为治疗该疾病的候选者。退化性疾病的例子包括糖尿病、神经退化性疾病、关节炎、癌症或自体免疫性疾病。表现量可由 mRNA 量及蛋白质量的任何一个测定。

[0017] 再一方面,本发明的特征为在患者中引进异源性核酸的方法。该方法包括下述步骤:取得上述组合物或细胞,其中这些细胞的至少一个包括异源性核酸;以及将该细胞投予至需要该异源性核酸的患者。该异源性核酸可编码多肽。该细胞一旦被投予,将在患者中表现多肽。

[0018] 术语“异源性”为一相对用语,当其用于描述核酸的部分时表示该核酸包含二个或以上亚序列,这些亚序列在天然中未发现彼此有相同关系。举例言之,经由重组产生的核酸典型地具有二个或以上来自不相关基因的序列,这些序列以合成方法被排列成具有新功能的核酸,例如启动子来自一来源以及编码区来自另一来源。该二核酸因此在其背景上彼此为异源性。该重组核酸,当加入细胞中时,该重组核酸相对于细胞的内源性基因为异源性。因此,在染色体中,异源核酸引进被整合入染色体的非原生性(非天然产)核酸,或非原生性(非天然产)染色体外核酸。相对照地,在本专利申请案的内容中,染色体的天然位置改变片,当其包含原生的内源性核酸序列时,对于突变细胞而言不被认为系属异源。相似地,异源蛋白质表示该蛋白质包含二个或以上在天然中未被发现彼此有相同关系的亚序列(例如,“融合蛋白质”,其中二亚序列由单一核酸序列编码)。该蛋白质可通过重组技术产生。

[0019] 术语“重组(recombinant)”当被提及时,如:于一细胞、或核酸、蛋白质、或载体,是指该细胞、核酸、蛋白质或载体已通过引入一异源性核酸或蛋白或一经改变的天然核酸或蛋白而修饰者,或指该细胞是源自于一细胞经该等修饰者。因此,例如,重组细胞表现的基因,其无法于该原生性(天然产)细胞中被发现的,或表现一第二套的原生性基因,该基因可正常或异常的表达、不足量的表达或完全不表达。

[0020] 于本发明的范畴内包括一细胞银行(cell bank)或库(library),其具复数个前述组合物,每一组成包含一多能性或全能性的培养细胞群。该细胞可为人类细胞或非人类细胞。该银行可通过:从复数个患者收获细胞以分别得到复数个胚叶细胞-类似性干细胞群;鉴定该等细胞群,对于各细胞群得到至少一种预定的特征;以及按照该至少一种预定的特征将该等细胞群分类以制备。于制备该库时,可进一步扩增细胞群。该特征的例子包含一患者的姓名、性别、身体状况(包含遗传疾病及 MHC 资讯)。

[0021] 一患者是指一人类或非人类的动物。非人类的动物的例子包含所有脊椎动物,如:哺乳动物,像是非人类的灵长类(特别是指高等灵长类)、狗、啮齿动物(如小鼠或大鼠)、天竺鼠、猫、农场动物(如马、牛、羊、或猪)、以及非哺乳类动物,像是鸟类、两栖动物、爬虫类等。于一较佳具体实施例中,该患者为一人类。于另一具体实施例中,该患者为一试验动物或适用于一疾病模式的动物。

[0022] 本发明之一或多个具体实施例的细节阐述于后文中。本发明的其他特征、目的、以及优点可通过说明书、图式及申请专利范围得以清晰明了。

附图说明

[0023] 图 1A 至图 1C 显示经溶血 (hemolysis) 以取得胚叶细胞 - 类似性干细胞群 (BLSCs) 的流式细胞分析直方图 (flow cytometry histograms) 的结果 ;

[0024] 图 2A 至图 2C 显示自血浆区段 (plasma fractions) 中取得胚叶细胞 - 类似性干细胞群 (BLSCs) 流式细胞分析直方图的结果 ;

[0025] 图 3A 至图 3C 图为一照片,其显示培养的胚叶细胞 - 类似性干细胞群 (BLSCs) 形成多层、网孔状 (mesh net) 结构 ;

[0026] 图 4 为一照片,其显示培养的胚叶细胞 - 类似性干细胞群 (BLSCs) 形成凝聚物 ;

[0027] 图 5 为一照片,其显示培养的胚叶细胞 - 类似性干细胞群 (BLSCs) 形成球状细胞凝聚物 ;

[0028] 图 6 至图 8 为显示从含有维生素 A 酸 (retinoic acid) 的胚叶细胞 - 类似性干细胞群 (BLSCs) 培养中制备出 SBR 细胞的照片 ;

[0029] 图 9 至图 12 为显示从含有转形生长因子 β (TGF- β) 的胚叶细胞 - 类似性干细胞群 (BLSCs) 培养中制备出 SBT 细胞的照片 ;以及

[0030] 图 13 为 RT-PCR 结果的照片,显示 GADPH 或 β - 肌动蛋白于 SBR 及 SBT 细胞的表现情形,以及不表现于 BLSC 中。

具体实施方式

[0031] 一般认为,ES 细胞可用于再生各种不同的细胞类型 (诸如脑中的神经元的或神经胶质细胞) 并从而治疗各种不同的退化性疾病或组织损伤。然而,在伦理及供给方面的考量已阻碍 ES 细胞的用途。而非胚胎来源的干细胞,诸如 :分娩后的干细胞 (如骨髓衍生的间叶干细胞 (MSCs, mesenchymal stem cells)), 为另一具前景的替代方案。虽然如此,由于供给方面的考量以及增生 / 分化能力的限制,该替代方法并不总是被接受。

[0032] 本发明关于从非胚胎来源中制备的干细胞群、SBR 细胞、或 SBT 细胞。就如同 ES 细胞一般,这些细胞亦为全能性或多能性。更重要者,该等细胞可以极高产率得到,且在活体中 (in vivo) 不会发育成畸胎瘤。该等细胞因而可被用于再生分化出具功能的细胞,以治疗各种不同退化性疾病或组织损伤。如下节实施例所示,SBR 及 SBT 细胞可于活体外 (in vitro) 被轻易的制造、维持及增殖,以及使用常规技术方法以诱导其分化。此外,将该细胞移植入一动物患者 (如 :一老鼠) 后,并无有丝分裂活化的细胞、畸胎瘤、或恶性生长等现象。基于这些优点,相对于其他干细胞,该等细胞呈现另一可供选择的方案。

[0033] 于本发明的一较佳具体实施例,这些 SBR 及 SBT 细胞是从胚叶细胞 - 类似性干细胞群 (BLSCs) 中所制备者。BLSCs 为在成年或年轻动物中的一群非胚胎干细胞。这些细胞为全能性且具有与胚胎干细胞相似的分化能力。参见 W02007/100845。BLSCs 包含正常的整套染色体,且 BLSCs 为细胞谱系未定 (lineage-uncommitted), 且可形成身体的所有体 (非生殖) 细胞。该等细胞亦可形成生殖配子精子及 / 或卵子,以及细胞,以及胚胎组织以及胎盘的胎儿部分。该细胞易对于谱系诱导剂、增生剂及分化抑制剂产生反应。另一方面,该等细胞对于发展剂 (progression agents) 较无反应。相似于外胚层 - 类似性干细胞 (epiblast-like stem cells), BLSCs 于细胞培养至长满 时并无接触抑制作用,但当其于

一合乎需要的营养供给时,则会形成多层长满的细胞层。BLSCs 没有表现代表前驱或分化细胞、胚层谱系干细胞、或外胚层 - 类似性干细胞的表型表现标记。相反地, BLSCs 表现一般及特定的胚胎性谱系标记,例如:胚胎性干细胞标记 CD66e、HCEA、CEA,以及 CEA-CAM-1。BLSCs 于成熟组织中常为静态。然而,当上述组织受到伤害, BLSCs 便会活化及分化以修复该受损的组织。

[0034] 相较于其他干细胞, BLSCs 可从一分娩后的组织中取得相当高的产率。例如, BLSCs 可从血液中被取得,其产率超过 2×10^8 / 每毫升血液。另一方面,由于 BLSCs 为静态且不会表现基因,故该等细胞于研究及治疗目的的用途亦受侷限。

[0035] 出乎预期的,以某种化学物质培养 BLSCs 可产生全能性或多能性干细胞,其可表现内生性基因及异源性基因。该两种全能性或多能性干细胞群为 SBR 细胞群及 SBT 细胞群。将 BLSCs 分别培养于含 RA 及 TGF- β 的培养基,以取得 SBR 细胞群及 SBT 细胞群。

[0036] BLSCs 可通过下节实施例所述的方法、或于 W02007/100845 所述的方法以制备。一般而言,该细胞可自成年或年轻动物的多种组织中分离出,包含血液、骨髓及骨骼肌。为了确认所分离的细胞确实为 BLSCs,可供检验的一些特征,包含 (1) 于悬浮液中的细胞尺寸少于 1 微米; (2) 细胞表面标记,如 CD66e⁺; 以及 (3) 台盼蓝染色呈阳性。细胞表面标记的抗体,如 CD66e 可被使用。其可以适用标记结合,如: 荧光异硫氰酸盐 (FITC, fluorescein isothiocyanate)、藻红蛋白 (PE, phycoerythrin)、或量子点 (quantum dots)。BLSC, 其为 CD66e⁺, 可进一步以流式细胞仪富化 (图 1 至图 2)。

[0037] 该富化后细胞群接着以标准技术测试。为了确认该等细胞的分化潜力,该等细胞可通过现有技术的方法被诱导以形成,例如: 神经元 - 神经胶质细胞、骨细胞、以及脂肪细胞。例如: 该等细胞可被继代及培养至长满 (confluence), 移转至一骨生成培养基或一脂肪生成培养基,并培养一段适当时间 (如: 三周)。骨生成分化能力可通过钙累积的矿化作用以评估,该矿化作用可通过 von Kossa 染色法观察。通过油红 O 将细胞内油滴染色,并于显微镜下观察以检测脂肪生成分化情形。对于神经分化方面,该等细胞可于一神经生成培养基中培养一适当时间 (如七天),接着将其以缺乏血清 (serum depletion) 进行处理,并以 β - 巯基乙醇 (β -mercaptoethanol) 进行培养。经分化后,该等细胞呈现具延伸的似轴突结构的折光细胞体形态 (refractile cell body) 以构成一网络。以谱系特异性标记进行免疫细胞化学染色,即可进一步导引确认神经的分化情形。该等标记的例子包含神经元特异性第三类 β - 微管蛋白 (Tuj-1)、神经丝状结构蛋白 (neurofilament)、以及 GFAP。

[0038] 另外,可通过 BLSC 不具接触抑制作用的特点,以确认该等分离细胞的身份。为此,可将该分离细胞培养至长满。于此条件下, BLSCs 可形成球形的细胞凝聚物、细胞均布的多层结构 (multiple confluent layers)、或网孔 (mesh-net) 结构。相反的, CD42⁺ 细胞无法形成前述结构,如细胞凝聚物。

[0039] 经该等确认后的 BLSCs 可进一步于一非分化性的培养基中以超过 10、20、50、或 100 代以上的细胞倍增率 (population doubling) 培养增殖,且其中无自发性分化、老化、形态变化、生长速度增加、或改变为具能力分化为神经元的迹象。该等细胞可于使用前以标准方法保存。

[0040] 为了制备 SBR 细胞,可将该 BLSCs 于含有 0.1 至 20 μ M RA 的环境中培养 2 至 8 周。于一较佳具体实施例中,该 BLSCs 于含有 1 至 15 μ M RA 的环境中培养 2 至 8 周,或更佳者

为,于含有 5 至 12 μ M RA 的环境中培养 3 至 4 周。由此制备的多能性或全能性细胞群的尺寸为 1 至 15 微米,且可于悬浮液中形成片状结构。任何市售可得的适用于细胞培养的 RA 皆可被使用。

[0041] 为了制备 SBT 细胞,可将该 BLSCs 于含有 1 至 40nM TGF- β 的环境中培养 2 至 8 周。于一较佳具体实施例中,该 BLSCs 于含有 2 至 20nM TGF- β 的环境中培养 2 至 8 周,或更佳者为,于含有 5 至 12nM TGF- β 的环境中培养 4 至 6 周。该多能性或全能性细胞群的尺寸为 1 至 15 微米,具一圆形的形状,且可形成凝聚物。虽然任何类型的 TGF- β 皆可使用,高纯度的 TGF- β 仍为优选。TGF- β 的例子包含哺乳动物的 TGF- β (如:人类 TGF- β)、或与哺乳动物的 TGF- β 具实质上相同生物活性的 TGF- β 。天然产的 TGF- β 及基因工程改造的 TGF- β 皆可被使用。通过 DNA 重组技术所取得的 TGF- β 可能与天然产的 TGF- β 具有相同的氨基酸序列、或一与其功能等同者。一“功能等同者”是指一天然产的 TGF- β 的多肽衍生物,如一蛋白具有一或多个点突变、插入、删除、截断(truncation)、融合蛋白、或其组合。术语“TGF- β ”亦涵盖化学修饰后的 TGF- β 。化学修饰后的 TGF- β 的例子包含结构改变的 TGF- β 、增加或删除其糖链、以及被一化合物,如聚乙二醇(polyethylene glycol),所结合的 TGF- β 。

[0042] 该 SBR 细胞及 SBT 细胞可基于其尺寸、接触抑制作用、台盼蓝染色排斥(如:台盼蓝染色阴性)以与 BLSCs 区别及确认。BLSCs 较 SBR 细胞及 SBT 细胞小(小于 1 微米),且缺乏接触抑制作用、或为盼蓝染色排斥。该 SBR 细胞及 SBT 细胞亦可根据相关的细胞标记,如 CD10⁺、CD90⁺、以及 CXCR4⁺ 以流式细胞分析,或其他标准分析方法,如 RT-PCR,以确认。

[0043] 如此制备的 SBR 细胞及 SBT 细胞可进一步与前述测试 BLSCs 的相同方式、或其他现有技术的技术,以测试其全能性及多能性。于适当的诱导条件下,该等细胞可于活体外分化为,如:脂肪细胞、软骨细胞、以及骨生成谱系的细胞群。此外,于前述诱导条件下,该等细胞具有能力去分化为神经胶质细胞。

[0044] 全能性及多能性可于活体测试。例如,当脑部缺血的大鼠接受大脑内 SBR 细胞或 SBT 细胞的脑内移植后,相较于以安慰剂(vehicle)处理的对照组大鼠,其神经功能明显被改善。此结果指出,于脑内授予的 SBR 细胞或 SBT 细胞可进入脑部、存活、迁移、以及改善中风后的功能恢复率。事实上,这些移植细胞于缺血性脑部中可分化为神经胶质细胞(GFAP⁺)、神经元(Nestin⁺、MAP-2⁺、以及 Neu-N⁺)、以及血管内皮细胞(vWF⁺),以增强神经可塑性(neuroplastic)的效用。大脑皮质的神经元活性可通过氢质子磁振频谱(¹H-MRS, Proton MR spectroscopy)评估,相较于对照组,于移植组的大脑皮质的神经元活性亦较大幅地增加。此外,于移植组的缺血性大脑半球中亦可发现神经滋养因子(neurotrophic factor)的调控表现显著性地增加。

[0045] 经此确认后的 SBR 细胞及 SBT 细胞可进一步于一非分化性培养基中以 10、20、50、或 100 代以上的细胞倍增率(population doubling)培养繁殖,且其中无自发性分化、老化、形态变化、生长速度增加、或改变为具能力分化为神经元的迹象。该等细胞可于使用前以标准方法保存。

[0046] 术语“增生”及“扩增”于此可交替用于与细胞相关,是指通过分裂以使同种类的细胞数增加。术语“分化”是指于细胞发育过程中为一特定功能转变特化,例如,细胞获得一或多个与初始细胞类型不同的形态特征及/或功能。术语“分化”包含谱系决定(lineage

commitment) 及终末分化过程 (terminal differentiation processes)。分化是可被评估的,例如:通过使用免疫组织化学法或本领域的技术人员所知的其他步骤,以监测谱系标记的出现与否。自先驱细胞衍生的后代分化细胞可能,但非必然,与该干细胞来源组织为相同胚层或组织。例如,神经先驱细胞及肌肉前驱细胞可分化为造血的细胞谱系。

[0047] 术语“谱系决定”及“特化”于此交替使用,是指一干细胞发展为一前驱细胞的过程,该前驱细胞决定所形成特定限制范围的细胞分化类型。已定向的前驱细胞通常具有自我更新或细胞分裂的能力。

[0048] 术语“终末分化”是指一细胞最终分化为一成熟、完全分化的细胞。例如,神经前驱细胞及肌肉前驱细胞可分化为造血细胞谱系,其终末分化为一属于特定细胞类型的成熟血球。通常,终末分化与中断细胞周期及停止增生有关。术语“前驱细胞 (progenitor cell)”于此提及,是指一细胞已决定成为一特定细胞谱系,且其通过一连串细胞分裂以发展成该谱系的细胞群。一前驱细胞的例子可为一肌母细胞,其仅可分化为单一类型的细胞,但其本身并不完全成熟或完全分化。

[0049] 1. 一般的用途

[0050] 本发明的 SBR 细胞及 SBT 细胞可应用于许多层面。可用于治疗退化性或遗传性疾病且能免除操作人类胚胎的道德考量。

[0051] 基于此目的,可自病患 (如缺乏组织或器官正常发育所需重要的功能性基因) 体内分离 BLSCs。自 BLSC 中生产出 SBR 细胞和 SBT 细胞之后,可将一能够编码一功能性基因的核酸载体转入细胞内。该载体可通过许多方式转入细胞内,包含磷酸钙共沉淀法、DEAE 葡聚糖媒介转染法、脂小体转染法、电穿孔法、显微注射法、或病毒媒介的技术。以不影响该细胞多能性的方法为较佳。该等技术的详述可见于美国专利号 7,422,736 及 5,591,625,及美国专利申请号 20020127715。于将功能性基因递送入细胞内后,随后以现有技术的方法将该等细胞移植至该病患体内。由于该细胞生产自该病人,因此,此治疗方法并不会引起免疫排斥现象。

[0052] 另外,可利用来自一健康个体所制备的 SBR 细胞和 SBT 细胞制造通用捐赠者细胞。用以制备通用捐赠者细胞的方法为现有技术,该等制备通用 SBR 细胞及 SBT 细胞的方法将于下详述。

[0053] 于适当的条件下,该等移植的 SBR 细胞及 SBT 细胞可发育成一功能性组织或器官。为促进其发育,可授予该病患诱导细胞发育的因子。该等因子可为小分子化合物、胜肽、及核酸。其例包含,但不限于,转型生长因子 β 、骨形态发生蛋白及神经生长因子。

[0054] 该等 SBR 细胞及 SBT 细胞对于谱系发育及分化的发育或分化机制的研究亦具其助益。使用该等细胞为一模式系统以鉴定诱导全能性多能性干细胞成为一特定组织或器官的条件。此外,可使用已知的差异性 cDNA 基因筛检方法以分离于发育过程中有参与的基因。参阅,如:Shen M. et al., Development, 124:429-42, 1997。可利用该等细胞,其已被诱导发育为一特定谱系,如前述的神经胶质细胞系,以制备一 cDNA 库。此库可用于分离及研究具差异性表现的基因。该等分离的基因可进一步用于研究其于各自阶段的角色。相关的技术皆为现有技术。参阅,如:美国专利号 7,422,736 及美国专利申请号 20060035373。该等 SBR 细胞及 SBT 细胞亦可使用已知方法用于发育为一器官或复制动物。参阅,如 Campbell K. et al., Nature, 380:64-66, 1996。因此,该等细胞对于宠物及畜牧产业极具价值,且可用

于保存濒临绝种的动物。

[0055] 2. 筛检方法

[0056] 前述的干细胞可被应用于筛检试验中,可鉴定以特定方法影响一特定细胞类型的药物,亦即该药物即可用于治疗与该细胞类型相关的疾病。

[0057] 因此,本发明一方面是关于一鉴定一制剂的方法,可通过将测试试剂与细胞进行接触,以找出可改变未分化 SBR 细胞及 SBT 细胞的功能的试剂。相较于未存在该测试试剂时的功能;若于存在该测试试剂时,该等细胞的功能或基因表现改变时,则该测试试剂为可改变该等细胞的功能或基因表现的试剂。术语“测试试剂”是指被用于检测其具有改变细胞功能或基因表现能力的任何分子。虽然该方法做为筛检方法,一般被用以鉴定出一先前未知但具有一预期活性的分子,然而,本发明的筛检方法亦可用于确认某已知拥有特定活性的制剂。

[0058] 该功能可为基因的表现,其一般是指于细胞中表现(或不表现),以及该制剂可通过增加或减少一表现基因(如:降低 CD66e 的表现量)的表现量、或通过开启一未表现基因(如:诱导特定谱系的抗原的表现)于细胞中的表现,以改变该功能。

[0059] 于一具体实施例中,此能影响细胞功能的制剂为一能诱导细胞分化且产生出已分化细胞的制剂。这些已分化的细胞可为多能性人类干细胞(如:造血干细胞)、或可为最终分化的细胞(如:肌肉细胞、神经细胞、血球细胞、结缔组织、或上皮细胞)。此方法就其本身而言,可用于鉴定一制剂,其可诱导分化 SBR 细胞及 SBT 细胞成为最终分化的细胞,如:胰岛 β 细胞、肝细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞或任何其他细胞类型。该此法所鉴定的制剂或化合物可被用于治疗退化性疾病、癌症或是免疫疾病。

[0060] 该表现量可通过 mRNA 表现量或是蛋白质表现量来决定。量测一样本的 mRNA 表现量的方法为现有技术。为量测 mRNA 表现量,细胞可被溶解,且存在于细胞溶解物中的 mRNA 量,无论纯化与否,皆可通过,如:杂交试验(使用可探测的标定特定基因的 DNA 或 RNA 探针),以及量化或半量化 RT-PCR(使用适合的特定基因引子对)量测。另外,量化或半量化的原位杂交试验可用于组织切片、或未溶解的细胞悬浮液,可使用一可探测(如:荧光或酵素)标定 DNA 或 RNA 探针。其他 mRNA 定量方法包含该 RNA 保护试验(RPA)方法,以及基因表现序列分析方法(SAGE),以及以阵列为基础的技术。

[0061] 量测一样本中蛋白质表现量的方法为现有技术。其中部分使用抗体(如:单株抗体或多株抗体),其可特异性地结合至一目标蛋白。于这些试验中,该抗体本身或结合其的第二抗体皆被标记为可供探测者。另外,该抗体可以与生物素结合。其存在能通过可探测标定的卵白素(一胜肽结合于生物素)以量测。这些方法的搭配组合(包含“多层夹心结构”试验)可用于增强该方法的灵敏度。一些蛋白质量测试(如:ELISA 或西方墨点法)可被应用于体液或细胞溶解物、或其他(如:免疫组织方法或荧光流式细胞仪)可应用于组织切片或是未溶解的细胞悬浮液的方法。适当的标定包括放射性核种(如: 125 碘、 131 碘、 35 硫、 3 氘或 32 磷)、酵素(如:硷性磷酸酶、辣根过氧化氢酶、冷光酵素、或 β -半乳糖苷酶)、荧光/冷光剂(如:荧光素、盐基桃红精、藻红素、GFP、BFP、以及由 Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA 所供应的 Qdot™ 奈米粒子)。其他可应用的方法包含定量免疫沉淀分析、或补体结合试验。

[0062] 一测试试剂可以是任何类型的分子,例如,一聚核苷酸、一胜肽、一拟胜肽、拟肽可

为乙烯化的拟肽 (vinylogous peptoids)、一小型有机分子或其相似物,且可通过各种方式以改变 SBR 细胞及 SBT 细胞的功能。例如,该测试制剂可通过在细胞外结合至一表现于细胞表面的受器,由此改变一功能,该功能由一通常结合并作用于该受器的配体所媒介。另外,该测试制剂可被动地或由主动运输机制以穿过细胞膜,并作用于细胞内而改变一功能。

[0063] 胜肽测试制剂可为任何胺基酸或胺基酸类似物的聚合物,且其可为三至四个残基,至几百或几千个残基的不同变化。胜肽测试制剂可通过化学合成、或使用蛋白质纯化、续以蛋白水解作用的方法制备,若有需求,可进一步利用层析法或电泳法进一步纯化,或可通过编码多核苷酸以表现。一胜肽测试制剂可为一已知胜肽,如:一天然产的胜肽,但亦可与该天然产的序列不同,例如:包含一个或多个胺基酸类似物。

[0064] 一多核苷酸制剂可为二个或多个去氧核糖核酸或核糖核酸的序列,其通过一磷酸双酯键以互相连结。可为 RNA 或 DNA,其可为一基因或其蛋白,一 cDNA、一 RNAi 试剂、一合成的多去氧核糖核酸序列、或其相似物,及其亦可为单股或双股,亦可为一 DNA/RNA 杂合体。可为一自细胞中分离的天然产的核酸分子,亦可为一合成分子,其通过如化学合成法或酵素法(如聚合酶链锁反应 (PCR, polymerase chain reaction)) 以制得。于多种具体实施例中,本发明的多核苷酸可包含核苷或核苷酸类似物,或一非磷酸双酯键的骨架键结。这些核苷酸类似物为现有技术且市售可得,而包含此类核苷酸类似物的多核苷酸亦同 (Lin et al., Nucl. Acids Res. 22 :5220-5234, 1994; Jellinek et al., Biochemistry 34 :11363-11372, 1995; Pagratis et al., Nature Biotechnol. 15 :68-73, 1997)。

[0065] 一多核苷酸测试制剂可与 SBR 细胞及 SBT 细胞接触、或通过文中所述的方法或现有技术,将之转入 SBR 细胞及 SBT 细胞。一般而言,而非必然,该多核苷酸被转入细胞内时,其可直接影响其功能,或影响其转录或转译、或两者的功能。例如,该多核苷酸可编码一胜肽测试制剂,其可于细胞内表现,并影响该细胞的功能。一多核苷酸剂亦可为,或编码出,一反股分子、一核糖酵素、或一三股合成试剂,其可被设计来标靶一或多个特定目标核酸分子。

[0066] 欲筛选的候选制剂或化合物(如:蛋白、胜肽、拟胜肽、拟肽、抗体、小分子、或其他药物)可通过本技术已知的组合库法中的多种途径的任一种得到。这些库包含:胜肽库、拟肽库(具有胜肽功能,但具有可抵抗酵素降解的新颖、非胜肽骨架的分子的库);空间可寻址平行固相或溶液相库 (spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries);通过解旋法或亲和性层析法筛选获得的合成分子库;以及该“单一珠粒单一化合物”分子库。参阅,如:Zuckermann et al. 1994, J. Med. Chem. 37 :2678-2685;及 Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12 :145。分子库的合成方法范例可见于,例如:DeWitt et al., 1993, PNAS USA 90 :6909;Erb et al., 1994, PNAS USA 91 :11422;Zuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37 :2678;Cho et al., 1993, Science 261 :1303;Carrell et al., 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 :2059;Carell et al., 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 :2061;以及 Gallop et al., 1994 J. Med. Chem. 37 :1233。分子库的化合物可呈现于液体中(如:Houghten, 1992, Biotechniques 13 :412-421),或珠粒上 (Lam, 1991, Nature 354 :82-84)、晶片 (Fodor, 1993, Nature 364 :555-556)、细菌 (美国专利号 5,223,409)、孢子 (美国专利号 5,223,409)、质体 (Cull et al., 1992, PNAS USA 89 :1865-1869)、或噬菌体 (Scott 及 Smith 1990, Science 249 :386-390;Devlin, 1990,

Science 249:404-406;Cwirlla et al.,1990,PNAS USA 87:6378-6382;Felici 1991, J.Mol.Biol. 222:301-310;以及美国专利号 5,223,409)。

[0067] 3. 退化性疾病的治疗

[0068] 于本发明范畴内,为一治疗退化性疾病、舒缓该疾病症状、或延缓该疾病于一患者中发作的方法。可通过标准技术诊断患者情况或疾病以鉴定出需治疗者。该治疗方法需投予一亟需其治疗的患者一有效量的前述 SBR 细胞或 SBT 细胞。

[0069] 一退化性疾病是指一疾病,其中感染组织或器官的功能或结构随着时间逐渐恶化,无论归因于遗传缺陷、受伤、缺乏适当细胞分化(如于细胞增生的疾病)、身体上正常磨损、或生活方式的选择。退化性疾病的例子包含神经性退化疾病(如:阿兹海默症、帕金森氏病、亨丁顿舞蹈症、多发性硬化症、以及肌萎缩性侧索硬化症(ALS, amyotrophic lateral sclerosis))、其他神经系统疾病(包含横贯性脊髓炎、脑部或脊髓神经创伤后产生的神经脱鞘、急性脑部受损、头部创伤、脊髓受损、周边神经受损、缺血性脑部受损、中枢神经系统的遗传性髓磷脂失调、癫痫、周产期窒息、窒息、缺氧症、癫痫重积状态、Shy-Drager 氏症、自闭症及中风)、癌症或相关癌症疗法产生的情况(如:化学疗法);代谢疾病(如糖尿病、尼曼匹克症);自体免疫或发炎相关疾病(如:红斑、发炎性肠道疾病(IBM, inflammatory bowel disease)、前列腺炎、骨关节炎、骨质疏松症、类风湿性关节炎、狼疮、糖尿病、及气喘)、眼疾(如:青光眼、色素性视网膜炎、诺里氏症、及黄斑部病变);心脏或循环系统疾病(如:动脉粥样硬化、心脏衰竭、心肌梗塞、及心血管疾病);血液疾病,如:Wiscott Aldrich 氏症候群;肌肉萎缩症;肠胃疾病;肾脏疾病;肝脏疾病;肺脏疾病、肾脏疾病(如爱迪生氏症)、烧烫伤或中风造成的损伤所导致的情况,包含:受损组织(如:肌肉损伤、老化受损细胞及老化受损组织)、和老化相关的情况(如:落发、雄性秃及圆形秃)、病毒情况(如:C 型肝炎病毒感染、及后天性免疫缺乏症候群)、以及其他可通过器官移植或干细胞修复、重生或改善其症状及/或与该疾病相关的症状。本发明的方法可被用以治疗勃起障碍、及整形外科、或女性的乳房植入。

[0070] 4. 治疗帕金森氏症和其他神经退化性疾病

[0071] 于本发明的范畴内,为一治疗脑部或中枢神经系统组织受损或减轻一患者体内疾病症状的方法。此方法包括鉴定出遭受或存在发展为脑部组织受损的潜在风险的患者。此患者可为人类、或非人类的哺乳类动物,如:猫、狗、或马。脑部组织受损的例子包含由大脑局部缺血(如:慢性中风)、或神经退化性疾病(如:帕金森氏症、阿兹海默症、脊髓小脑症、或亨丁顿舞蹈症)所造成的损伤。可通过标准技术诊断患者情况或疾病以鉴定出需治疗者。该治疗方法须投予一亟需其治疗的患者一有效量的前述的 SBR 细胞或 SBT 细胞、或一活性成分/化合物。

[0072] 此细胞的疗效可通过标准方法以测。例如,欲确认其促进脑血管新生的功用,可分别于治疗前后通过标准脑部影像技术诊察一患者,例如:电脑断层扫描(CT, computed tomography)、都卜勒超音波影像技术(DUI, Doppler ultrasound imaging)、磁振造影(MRI, magnetic resonance imaging)、以及氢质子磁振频谱(^1H -MRS)。例如,氢质子磁振频谱(^1H -MRS)代表一非侵入性方法,其可获取和脑部代谢活动相关的生化资讯(Lu et al., 1997, Magn. Reson. Med. 37, 18-23)。此技术可用于评估干细胞移植前后和大脑局部缺血有关的代谢变化。例如,可用于研究脑内 N-乙酰天门冬氨酸(NAA, N-acetylaspartate)的浓

度,其为脑部神经元完整性的指标。虽然神经元碎片中的 NAA 重新分布和截留限制了其可作为一定量用神经标记的用途,然而,大脑局部缺血时的脑部 NAA 浓度下降仍可被作为神经元丧失或功能异常的指标 (Demougeot et al., 2004, J. Neurochem. 90, 776-83)。因此,通过氢质子磁共振频谱 (^1H -MRS) 测得的 NAA 浓度可作为一有效指标以追踪大脑局部缺血后经干细胞移植后的效用。

[0073] 5. 癌症

[0074] 前述的 SBR 细胞或 SBT 细胞亦可被用于治疗癌症及其他细胞增生的疾病。一细胞增生疾病其特征是指一未受控制、自发性细胞生长的疾病 (包含恶性及非恶性的生长)。术语“癌症”是指该类疾病,其特征在于无法控制的细胞生长、侵入和有时候会转移。癌细胞具自发性生长的能力,例如:一不正常的快速增生细胞生长的状态或状况。该术语意欲包含所有类型的癌化生长、或致癌过程、转移组织或恶性转型细胞、组织、或器官、无关乎其为何组织病理类型、或侵入阶段。癌症的范例包含,但不限于,癌及肉瘤,如:白血病、肉瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤、嗜铬性细胞瘤、肝癌、卵巢瘤、皮肤癌、睾丸癌、胃癌、胰腺癌、肾癌、乳癌、前列腺癌、大肠癌、头部或颈部癌、脑癌、食道癌、膀胱癌、肾脏皮质癌、肺癌、支气管癌、子宫内膜癌、鼻咽癌、子宫颈癌或肝癌、及其他原发部位不明的癌症。

[0075] 6. 基因疗法

[0076] 前述细胞及方法可被用于各种不同的已知基因治疗方法中。基因疗法包含活体外 (ex vivo) 及活体内 (in vivo) 技术。尤其是,前述干细胞可于活体外以一寡核苷酸调节子或一核酸分子编码该调节子进行基因工程改造,将该等工程改造后细胞提供给一被治疗的病患。细胞培养物可被调配以授予一病患,例如,通过分离该细胞 (如:通过机械式分离),并将该细胞与一医药上可接受载剂 (如:磷酸盐缓冲液) 混合均匀。或者,细胞可被培养于一适用的生物相容性载体 (support),并将之植入一病患。该等经工程改造的细胞一般为自体衍生的,以便于避免同种异体或异种异体排斥。该等活体外 (ex vivo) 方法皆为现有技术。

[0077] 该等细胞可通过已知技术授予寡核苷酸或核酸分子以进行工程改造。例如,寡核苷酸及其他核酸分子可通过直接注射一“裸露 (naked)”核酸分子来授予 (Felgner 及 Rhodes, (1991) Nature 349:351-352; U. S. Pat. No. 5,679,647), 或一核酸分子可被配制于一含有一或多个可促进核酸分子被细胞吸收的成分的组合物中,该成分可为皂苷 (saponins) (例如请参阅美国专利号 5,739,118), 或阳离子聚胺 (例如请参阅美国专利号 5,837,533); 或通过微粒子轰炸 (例如:透过使用一“基因枪”; 杜邦 (Dupont) 制药的基因枪 (Biolistic)); 或通过将该核酸分子以脂质、细胞表面受体、或转染剂涂覆; 或将该核酸分子包覆于一微脂体、微粒、或微胶囊中; 或通过授予一与胜肽链结的核酸分子,该胜肽已知可进入细胞核; 或通过授予一与配体链结的核酸分子,该配体易被受体媒介的胞饮作用所影响,其可用以标定出可专一性表现该类受体的细胞类型。

[0078] 一核酸-配体复合物可被形成,其中该配体包含一融合病毒胜肽以瓦解内体,可使得该核酸免于被溶酶体降解; 或该核酸分子可作为细胞专一性吸收的目标,以及通过一特定受体为目标以于活体内 (in vivo) 表现。此外,一引入、表现及累积反股寡核苷酸的有效率的方法已于美国专利号 6,265,167 中被描述,其可使得该反股寡核苷酸与一正股 mRNA 于细胞核中杂合,亦可避免反股寡核苷酸被加工处理或运输至细胞质。本发明亦考量于细

胞内引入该核酸分子,以及随之通过已知同源性重组技术于宿主细胞 DNA 进行嵌合以表现。

[0079] 该多核苷酸亦可被嵌入于一适用表现载体。一些众所周知的适用于基因疗法应用的载体(参阅,例如:Viral Vectors:Basic Science and Gene Therapy, Eaton Publishing Co. (2000))。

[0080] 该表现载体可为一质体载体。生成及纯化质体 DNA 的方法快速且简易。此外,当发生消除分立实体的基因毒性事件(discrete entity eliminating genotoxicity issues)而可能引起染色体整合时,质体 DNA 一般不会整合入宿主细胞的基因组,而是维持于游离基因位置(episomal location)。现今已有各种不同市售可得的载体,以及包含该等源自大肠杆菌及枯草杆菌的质体,其中多被特别设计为可用于哺乳动物系统中。于本发明中可能被使用的质体的例子包含,但不限于,真核表现载体 pRc/CMV (Invitrogen)、pCR2.1 (Invitrogen)、pAd/CMV 以及 pAd/TR5/GFPq (Massie et al., (1998) Cytotechnology 28:53-64)。一示范具体实施例中,该质体为 pRc/CMV、pRc/CMV2 (Invitrogen)、pAdCMV5 (IRB-NRC)、pcDNA3 (Invitrogen)、pAdMLP5 (IRB-NRC)、或 PVAX (Invitrogen)。

[0081] 该表现载体可为一病毒载体。病毒载体的例子包含,但不限于,该等源自无法自我复制的反转录病毒、慢病毒、腺病毒以及腺病毒相关病毒的病毒载体。反转录病毒载体,以及腺病毒相关病毒载体为目前重组基因递送系统中的首选,其可供活体内(in vivo)传递外源性寡核苷酸、或基因,特别是可传入人体。该等载体使得基因可有效率地进入细胞,以及使该传递后的核酸可稳定的与宿主的染色体 DNA 整合。一取决使用反转录病毒的主要先决条件为该等病毒使用时的安全性,尤其需注意野生型病毒于细胞群中蔓延的可能性。反转录病毒载体可源自的反转录病毒,包含,但不限于,莫洛尼鼠类白血病病毒、胰脏坏死病毒、反转录病毒(像是劳斯肉瘤病毒、哈维氏鼠类肉瘤病毒、禽白血病病毒、长臂猿白血病病毒、人类免疫缺乏病毒、腺病毒、骨髓增生肉瘤病毒、以及乳腺肿瘤病毒。特定的反转录病毒包含 pLJ、pZIP、pWE 以及 pEM,该等对于现有技术是众所周知的。

[0082] 7. 细胞库

[0083] 本发明的一特征在于一干细胞银行或库,其可便利地及有系统地存取不同干细胞系。该银行或库中的干细胞,源自前述 BLSC、SBR 细胞、或 SBT 细胞,其可来自于健康的个体、或具有已知疾病状态的患者或该症状对于使用者(如:研究人员)来说是重要、珍贵的。具有从前述干细胞分化的细胞的细胞银行或库亦在本发明的范畴中。该等自干细胞所分化的细胞例子包含脑细胞、神经元细胞、星状胶质细胞、神经胶质细胞、T 细胞、B 细胞、软骨细胞、骨细胞、胰岛细胞、脂肪细胞、心脏细胞、肝细胞、肾细胞、肺细胞、肌肉细胞、以及眼细胞。该患者可为人类或非人类的脊椎动物。该干细胞可源自任何哺乳动物物种,例如人类、老鼠、兔、牛、猪等。

[0084] 于银行或库内的细胞是根据预定特征来分类,该特征包含表型资讯、形态特征、分化形态、血型、主要组织相容性复合体、捐赠者的疾病状态、或基因型资讯(如:单一核苷酸多型性(SNP, single nucleated polymorphisms)的一特定核酸序列与一基因、基因体或粒线体 DNA 相关)。该等细胞于一适当环境中(一般通过冷冻)被保存,以维持该干细胞存活并仍具功能。分类可包括建立各细胞群特征的集中纪录,例如,但不限于,汇集的书面记录(assembled written record)、或输入有资讯的电脑资料库(database)。本质上,此

具体实施例涉及一干细胞银行的制备。该干细胞银行可帮助使用者从许多样本中筛选出适用于使用者需要的特定干细胞样本。此外,于本发明的另一具体实施例涉及一干细胞银行,其包含来自于各别来源的许多干细胞样本,且该等样本基于至少一预定特征以特征化及分类。于另一具体实施例涉及一建立干细胞银行的方法,包含从许多来源收集的干样本(stem samples);根据至少一预定特征以分类该等样本,及于特定条件下保存该等细胞,使其存活。

[0085] 于本发明的范畴,是指包含许多干细胞群的一干细胞银行系统于特定条件下置于个别容器中,使该干细胞群得以存活;一电脑资料库包含至少一处理模组、一显示器及一包含对于每一干细胞群的至少一特征资讯的储存媒体;以及至少一程式码模组,当使用者下达指令后,可通过该程式码模组使产生的资讯可于该显示器上被浏览。于一特定的具体实施例中,本发明其特征之一在于该干细胞银行系统的干细胞群是来自于一患有疾病状况的患者的干细胞。该疾病状况可包含前述的退化性疾病。自患有不同疾病的患者所收集的干细胞,皆被特征化。该等特征被输入于一电脑资料库中。此外,亦或是,该等细胞基于一特定表现型但并非必然与一疾病状况有关来特征化。例如,肝细胞可基于其可代谢某类化合物来特征化,如:咖啡因、酒精、药物制剂等化合物,以研究这些不同代谢能力的遗传本质,或与其相关的基础生理机能。其他细胞类型可依据其功能性及/或形态表现型来特征化。

[0086] 于一些具体实施例中,自 SBR 细胞或 SBT 细胞分化的细胞,可通过引入一工程改造的载体、或其他遗传物质,而使其可能易受影响分化或排斥分化的状况所影响。排斥分化包含操控一细胞使其具有一较不会分化细胞的特性。

[0087] 本发明的干细胞库可通过前述方式以筛选出可用以治疗退化性疾病、癌症或免疫疾病的制剂或化合物。该库可适用于高速筛选系统,及可帮助鉴定出对于一特定患者特别有效的制剂。对于一高速筛选系统,该等干细胞可被导入于一多孔盘的孔中或于一载玻片或微晶片,并与测试制剂接触。一般而言,该等细胞于一阵列中为有组织化的,尤其是指一可寻址的阵列,这样即可便于以机器人操作该等细胞及溶液,及监测该等细胞,该等操作特别与被检测的功能有关。使用一高产率形式的优点在于可同时进行检验许多测试试剂,以及,视需要,对照组的反应可与测试条件完全相同的条件下进行反应。因此,本发明的筛选方法提供一工具从一个、一些或大量的测试制剂中筛选以鉴定出一可改变干细胞功能的制剂,例如,该制剂包含:可使该细胞分化为一所欲的细胞类型、或可避免自发性分化者,例如:可维持高量表现的调控分子。

[0088] 8. 通用捐赠者细胞

[0089] 前述的干细胞可通过基因工程方法改造以产生组织抗原相容的捐赠者细胞或组织以作为移植之用。移植及细胞治疗的目标是以具功能性的捐赠者组织或器官将衰竭的组织或器官成功地取代。然而,为求成功移植,需克服两道屏障:适合的捐赠者组织或器官的取得,以及免疫排斥现象。取代衰竭的组织或器官以及免疫排斥的治疗,受限于可接受的捐赠者的数量有限,以及于长期免疫抑制治疗方法中需同时投予具毒性的免疫抑制药物。当前及实验性移植的方法主要倚赖亲属捐赠者、和其他极为少量的同种异体或异种异体捐赠者。前述基因工程改造的干细胞可用来克服该等限制。

[0090] 更特定而言,本文所述的干细胞可利用基因工程操作改造,使其不于细胞表面表

现第二类主要组织相容性复合体分子 (class II MHC molecules)。较佳地,该等细胞通过工程改造以使其不表现大体上所有细胞表面上的第一类及第二类主要组织相容性复合体分子。如本文所用,术语“不表现”是指由于细胞表面上不足量的表现,故无法引起反应,或是,所表现的蛋白质有所缺陷而无法引起一反应。

[0091] 该主要组织相容性复合体分子是指 HLA 分子,专指第一类 HLA A、B 及 C,以及第二类 HLA DP、DQ、及 DR、以及其次分类。此术语常解释为专指人类主要组织相容性复合体,然于本文可衍生包含来自其他捐赠者物种的等效主要组织相容性复合体基因,例如:若该细胞来源为猪,则术语 HLA 是指猪的主要组织相容性复合体分子,无论是指第一类或第二类主要组织相容性复合体。当第二类主要组织相容性复合体分子被移除时,CD4+T 细胞即无法辨认被基因工程改造的内皮细胞;当第一类及第二类主要组织相容性复合体分子皆被移除,则无论 CD4+ 或 CD8+ 细胞皆无法辨认经修饰的细胞。

[0092] 较佳的干细胞基因修饰包含 1) 破坏内生性非变异胜肽链 (invariant chain) 基因,其作用于第二类 MHC 分子的组装和运送至细胞表面,以及抗原性胜肽的装载;以及 2) 破坏内生性 β_2 -微球蛋白基因 (β_2M gene),其编码所有第一类 MHC 分子表现于细胞表面时所需的蛋白质。另外,仅非变异胜肽链 (invariant chain) 基因被破坏。非变异胜肽链 (invariant chain) 被认为于抗原性胜肽片段嵌入第二类 MHC 分子时所需。总而言之,抗原性胜肽和主要组织相容性复合体为 T 细胞所辨识。于抗原胜肽不存在时,T 细胞辨识即无法正常达成,第二类 MHC 分子亦无法正确折叠。因此,在缺乏非变异胜肽链 (invariant chain) 的细胞中,胜肽的呈现将受阻碍,纵使另存在极少量的细胞表面 MHC,其仍缺少胜肽因而无法引起免疫反应。

[0093] 该等基因的破坏可通过同源重组基因标靶技术以达成。该等技术为现有技术。参阅美国专利号 6916654 及 6986887, Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435438;以及 Koller et al., 1990 Science 248:1227-1230。

[0094] 9. 组合物

[0095] 本发明提供一医药组合物,包含前述细胞或活性成分/化合物。医药组合物可通过混合一治疗有效量的该等细胞或活性制剂/化合物,及视需要包含其他活性物质,及一医药可接受的载剂以制备。该载剂可为不同形式,视投予的路径决定。其他活性物质的例子包含已知的活性化合物或通过前述筛选方法所鉴定者。

[0096] 前述医药组合物可通过常规的医药赋形剂及制备方法来制备。所有赋形剂皆可与崩解剂、溶剂、粒化剂、保湿剂及黏合剂进行混合。于本文所述的术语“有效量”或“治疗有效量”是指一可使得特定疾病的至少一症状或参数得以显着地改善的数量。前述细胞的治疗有效量可由已知方法决定。用以治疗一疾病的有效量可通过该领域具有通常技艺者以已知试验方法来容易地决定。而用以投予一病患时的确切数量将依照该疾病的情况及严重度,以及该病患的生理情况而有所不同。任何症状或参数的显着地改善可由本领域的技术人员或由医师对于该病患的报告来决定。将被明了的是,前述疾病的任何症状或参数具任何临床上或统计上显着减弱或改善者皆隶属本发明的范畴内。临床显着地减弱或改善意指对于该病患及/或于一医师是显而易见的。

[0097] 词组“医药可接受的”是指当投予一人类时,该等组合物中的分子个体及其他成分是生理上可接受的,且一般不会产生不欲的反应。较佳地,术语“医药可接受的”意指受

联邦监管机关、或一州政府、或列于美国药典、或于其他一般公认药典所公认可用于哺乳动物,特别是指人类。医药可接受盐类、酯类、酰胺,以及前驱药,是指该些盐类(如:羧酸盐、氨基酸添加盐)、酯类、酰胺,以及前驱药,于可靠的医疗判断范畴内,其可适合使用于与病患组织接触,且无过渡毒性、刺激性、过敏反应等;且需考量该等用途的合理的利益/风险比及有效性。

[0098] 一可应用于前述医药组合物的载剂是指一稀释剂、赋形剂、或一载体,其可被授予一化合物。该等医药载剂可为无菌的液体,例如水及油。优选以水或水溶液、盐液、及液态葡萄糖及甘油溶液作为一载剂,特别可作为注射溶液。适用的医药载剂已于由 E. W. Martin 所撰的 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 第 18 版中描述。

[0099] 该等前述细胞可透过注入或注射(例如:静脉注射、鞘内注射、肌肉注射、腔内、气管内、腹腔或皮下)、口服、皮肤穿透、或其他已知方法,以授予一个体。授予可能每两周一次、一周一次、或更频繁,但当该疾病或失调于一稳定阶段时,其授予频率则可能会减少。

[0100] 异源的及自体的细胞皆可被使用。于前者情况,HLA 的吻合将可避免或降低宿主的反应。于后者情况,自体的细胞从一患者中被富化及纯化后,进行保存以备用。该细胞可活体外培养于一含有宿主、或移植 T 细胞的环境中,并重新被送回该宿主。此举可使该等细胞于该宿主内被视为自体的细胞,并较可降低 T 细胞活性。

[0101] 剂量和授予频率将取决于临床症状,其经确认缓解阶段的维持,或于急性期的至少一个或多个,较佳为多于一个的本领域技术人员所知的临床症状被减少或消失。更普遍者,剂量和授予频率部分将取决于一疾病状况或失调的病理症状及临床和亚临床症状经前述组合物治疗后的削弱情形。于病患或被治疗的哺乳患者、及医师的诊断,其剂量和授予方案可根据年龄、性别、身体状况的管理,以及共轭利益和副作用来调整,该等技艺皆为本领域技术人员所知悉。于所有前述方法中,该等细胞以每次 1×10^4 至 1×10^{10} 的量授予一患者。

[0102] 以下特定的实施例仅供示例说明,非用以限制未于本发明揭示者。无需进一步详细阐述,相信该领域技术人员可基于本文的说明,将本发明发挥至淋漓尽致。

[0103] SBR 及 SBT 细胞的制备

[0104] 将 BLSCs 活化、纯化及扩增的方法,已于 WO/2007/100845 中被描述。于此实施例中,BLSCs 从人类患者的血液中以两种方法纯化。该等分离细胞以流式细胞仪分析。结果显示于图 1A 至 1C 及图 2A 至 2C。结果发现,该两种方法分别可获得 200×10^6 及 230×10^6 BLSC/毫升血液。

[0105] 该纯化后的 BLSCs 可于 StemBios-001 中进行培养。为了产生 SBR 及 SBT 细胞,BLSCs 可于 StemBios-002 培养基中培养两周。接着,该等 BLSCs 遂于一含有 0.1 至 $20 \mu\text{M}$ RA、或 1 至 40nM TGF- β 的 StemBios-003 培养基中培养超过二至六周。可观察到该等培养细胞其形态及尺寸逐渐地变化(图 6 至 12 图)。该等细胞分别命名为 SBR 及 SBT 细胞。

[0106] 该 SBR 及 SBT 细胞以标准方法测试其发育及分化能力。可发现该等细胞可分化为源自三种胚层的细胞,例如:外胚层、中胚层,及内胚层。亦可观察到该等所有或大部分细胞皆为 $\text{CD}10^+$ 、 $\text{CD}90^+$ 、 $\text{CD}105^+$ 、及 $\text{CXCR}4^+$ 。

[0107] SBR、SBT 及 BLSCs 的 RT-PCR 结果

[0108] SBR 细胞、SBT 细胞及 BLSCs 的基因表现是可被检测的。是以一 Qiagen RNA 萃取套

组 (Qiagen, CA)、Paris kit (Ambion)、或 RNazol kit (InvitroGen), 从 SBR 培养细胞或 SBT 培养细胞 (每一种皆超过六百万个) 分离出总 RNA。依操作手册 (Qiagen) 可使用 0.25ng 寡-(dT)12-18 及反转录酶 (Qiagen) 将 2.0 μ g RNA 制备为 cDNA。然而, 从超过 1 亿个 BLSCs 中无法取得可侦测的 RNA。

[0109] RT-PCR 是以 94 °C (15 秒)、55 °C (15 秒)、72 °C (20 秒) 的条件进行 30 个循环。 β -肌动蛋白的引子对为: 正向 5'-ACAAAACCTAACTTGCGCAG-3'; 反向 5'-TCCTGTAACAACGCATCTCA-3'。GADPH 的引子对为: 正向 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3'; 反向 5'-GTACTCAGCGGCCAGCATCG-3'。该等结果显示于图 13。可发现 β -肌动蛋白及 GADPH 可表现于 SBR 细胞及 SBT 细胞, 而于 BLSCs 则无表现。

[0110] 其他具体实施例

[0111] 所有于本说明书所揭露的特征可以任何组合方式组合。于本说明书中所揭露的每一特征可通过另一相同、等效、或相似目的的可替换特征来置换。因此, 除非明确声明, 否则每一揭露的特征仅为各种等效或相似特征的一般系列的示例。

[0112] 于前述说明中, 该领域技术人员可轻易确认本发明的必要技术特征, 在无脱离其精神及范围下, 可对本发明进行各种不同改变及修改以使其适用于各种不同的用途及情况。因此, 其他的具体实施例亦在以下申请专利范围的范畴内。

经溶血(hemolysis)纯化胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)-(胚叶细胞-类似性干细胞
(BLSC)数量 200×10^6 个细胞/毫升)

5.81%

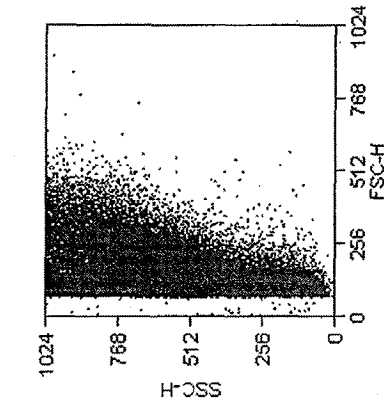


图 1A

FI1: CD10-FITC
FI2: CD66e-PE
FI4: CD90-APC

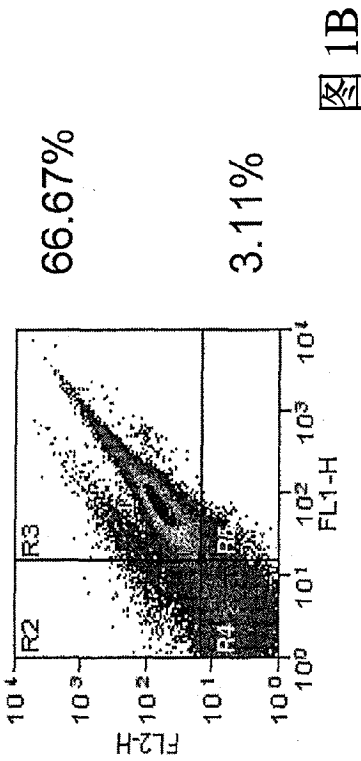


图 1B

0.62%

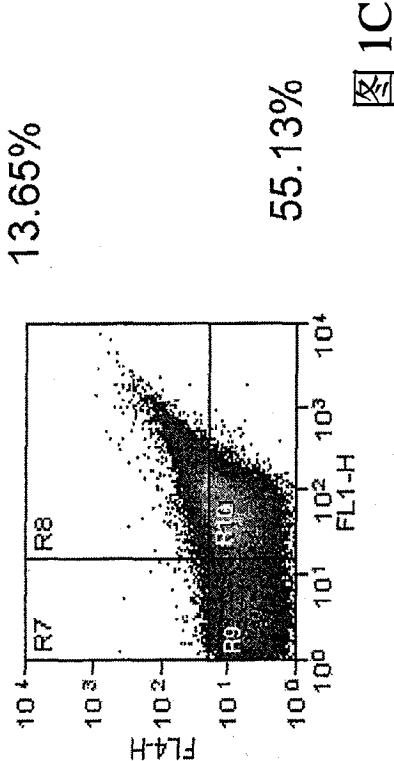


图 1C

从血浆区段(plasma fractions)中纯化胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)-(胚
叶细胞-类似性干细胞(BLSC)数量 239×10^6 个细胞/毫升)

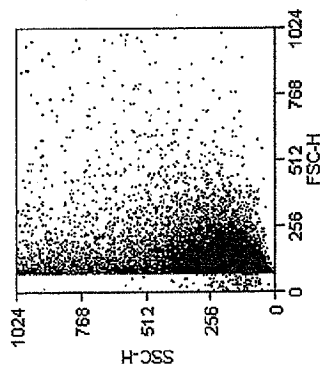


图 2A

F1: CD10-FITC
F2: CD66e-PE
F4: CD90-APC

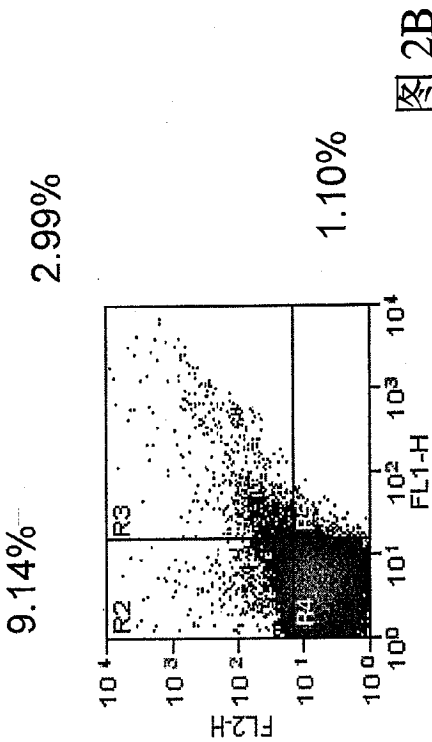


图 2B

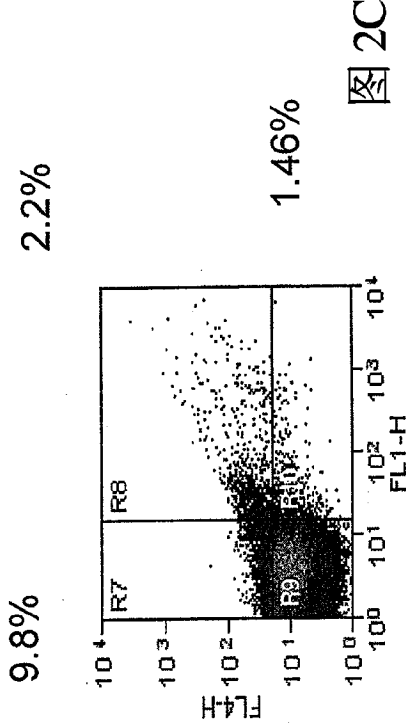


图 2C

培养胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)-形成多层、网孔结构(200x)



图 3A

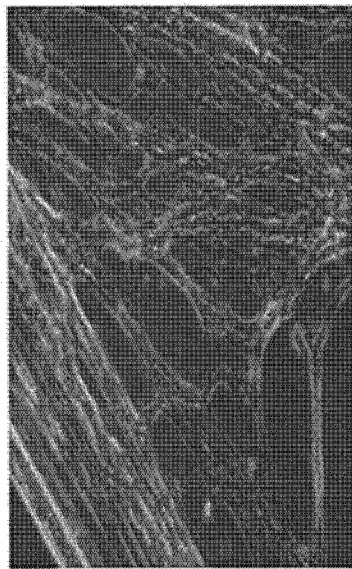
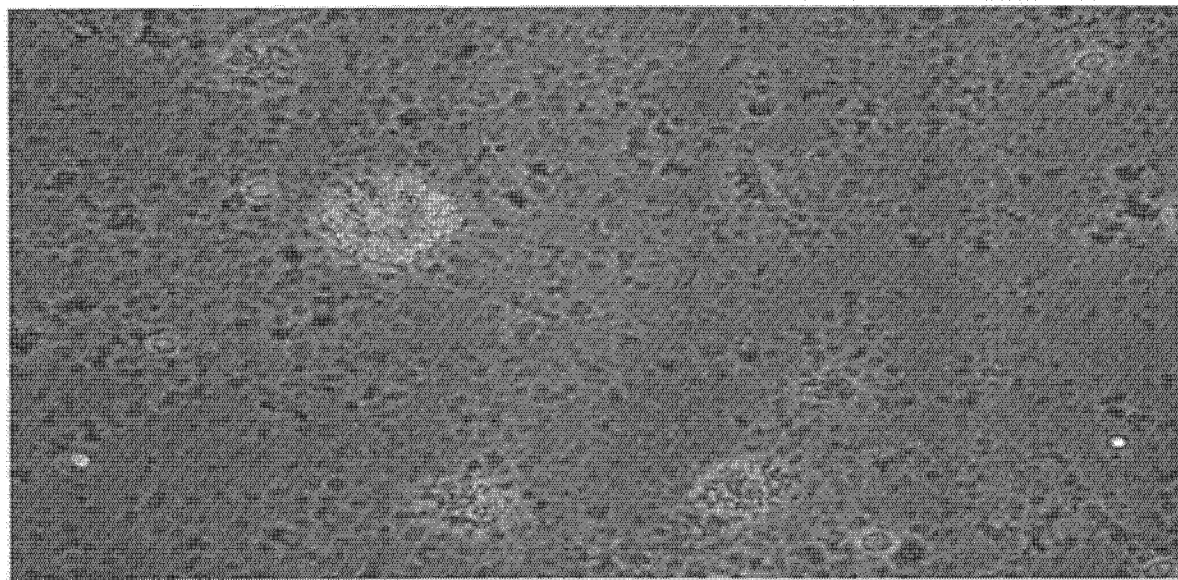


图 3B



图 3C

培养胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)-凝聚物



200x

图 4

胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)凝聚-圆形细胞群

胚叶细胞-类
似性干细胞
(BLSCs)

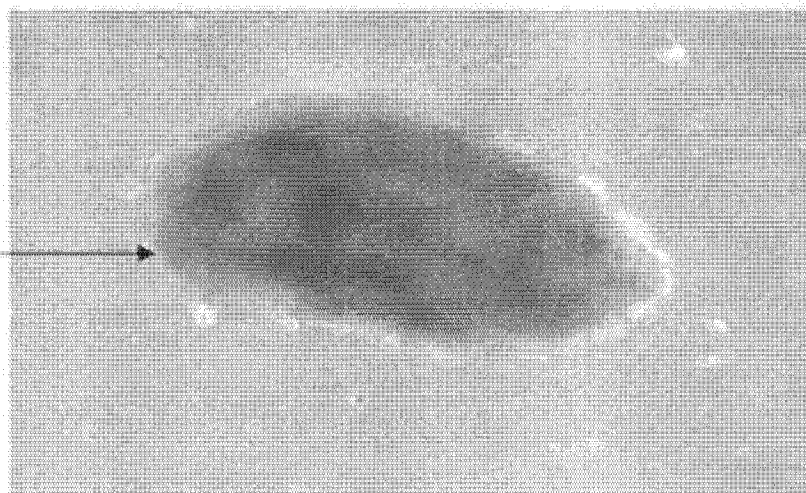
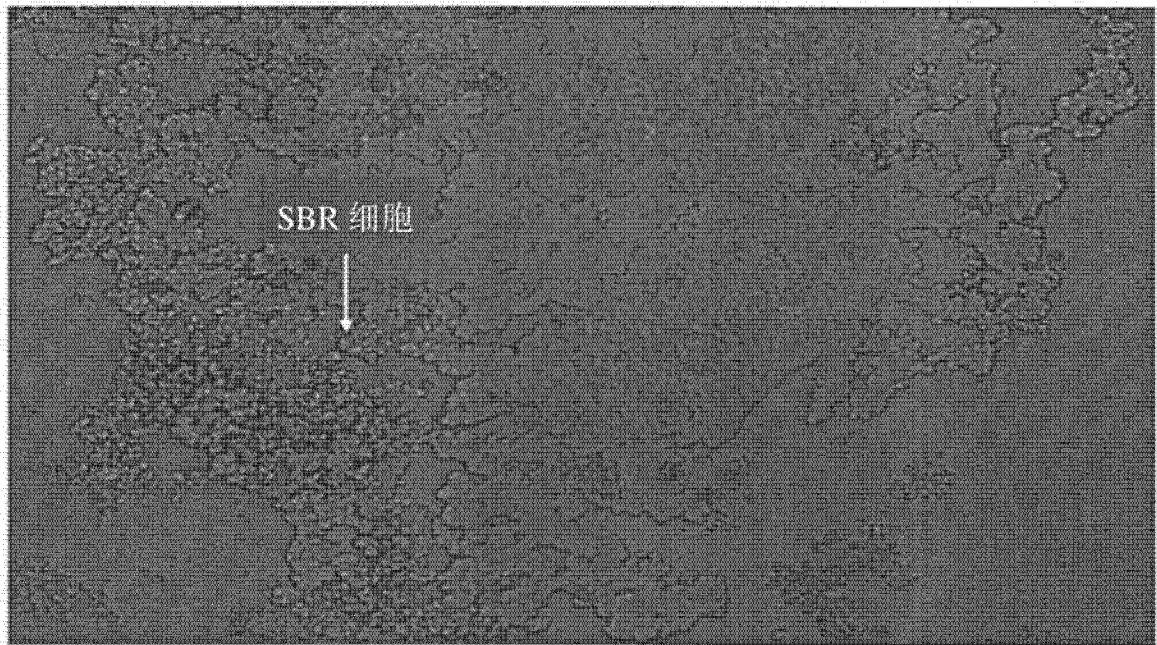


图 5

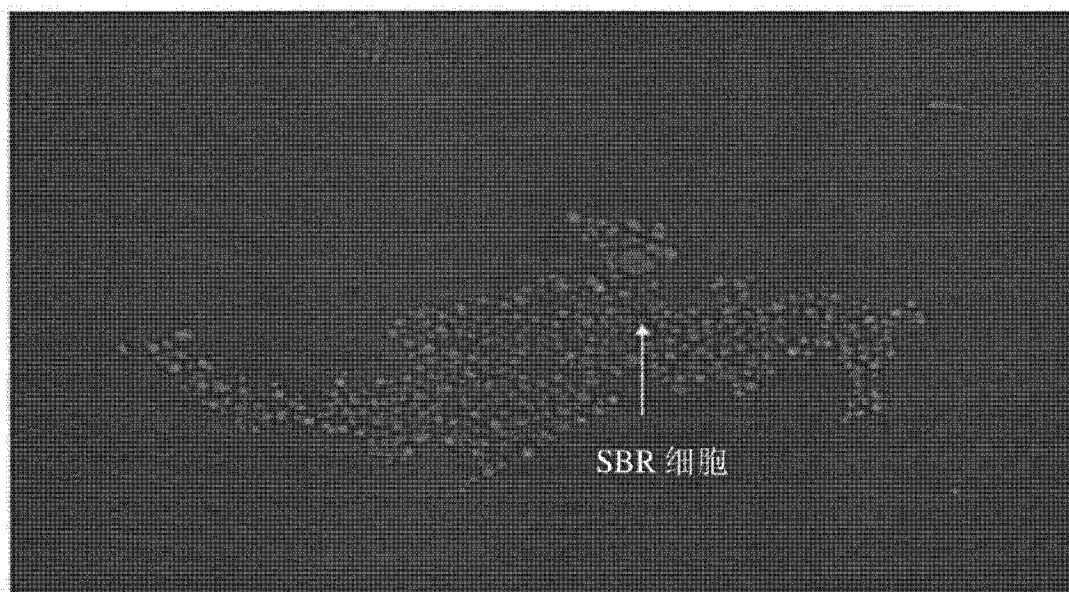
胚叶细胞-类似性干细胞(BLSCs)+维生素 A 酸(Retinoic Acid)



100x

图 6

胚叶细胞-类似性干细胞(BLSCs)+维生素 A 酸(Retinoic Acid)



200x

图 7

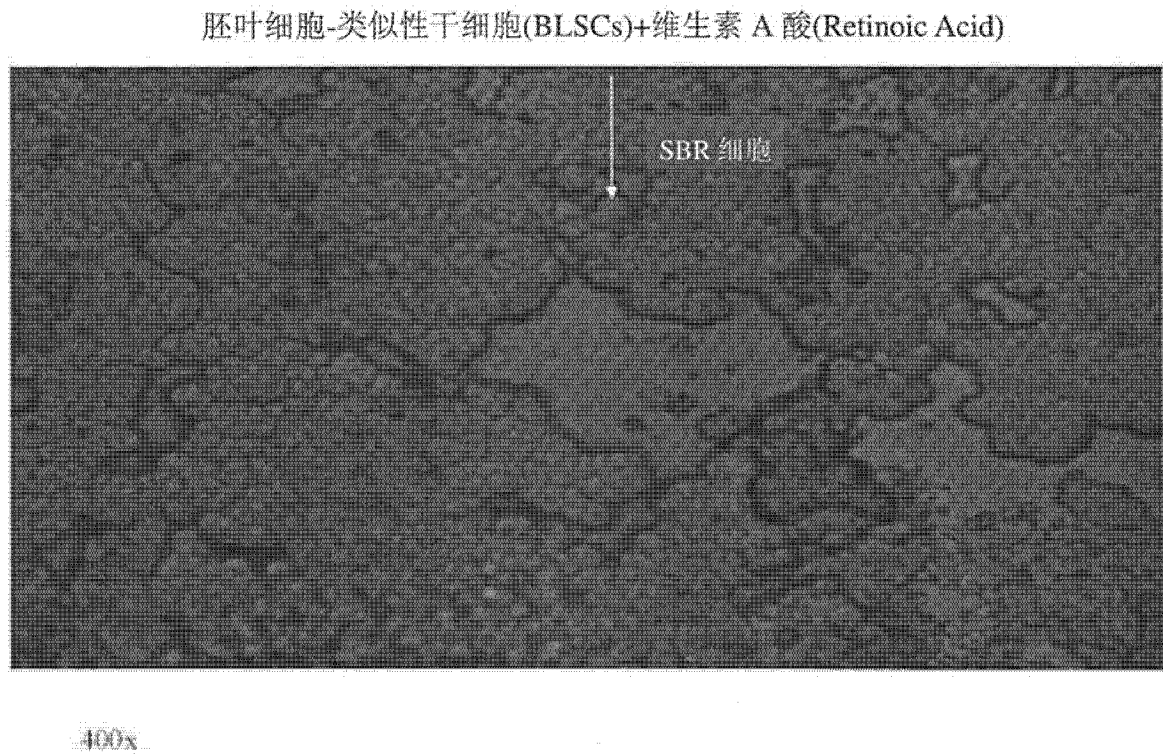
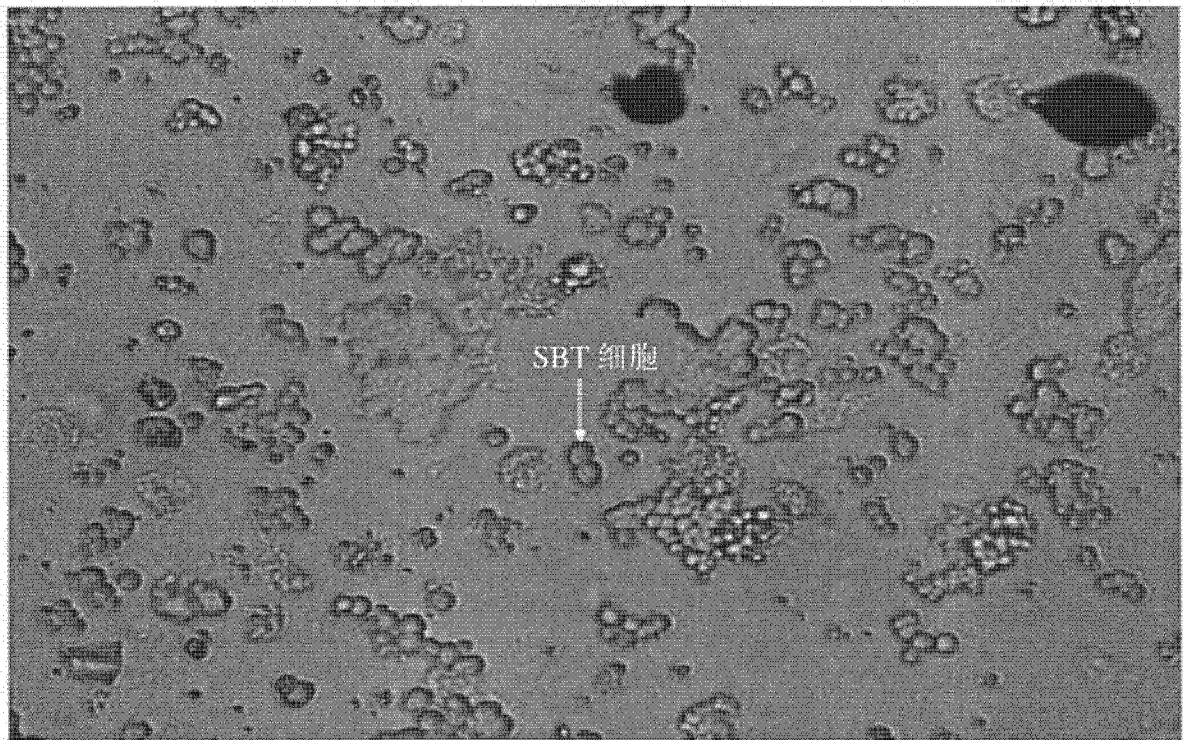


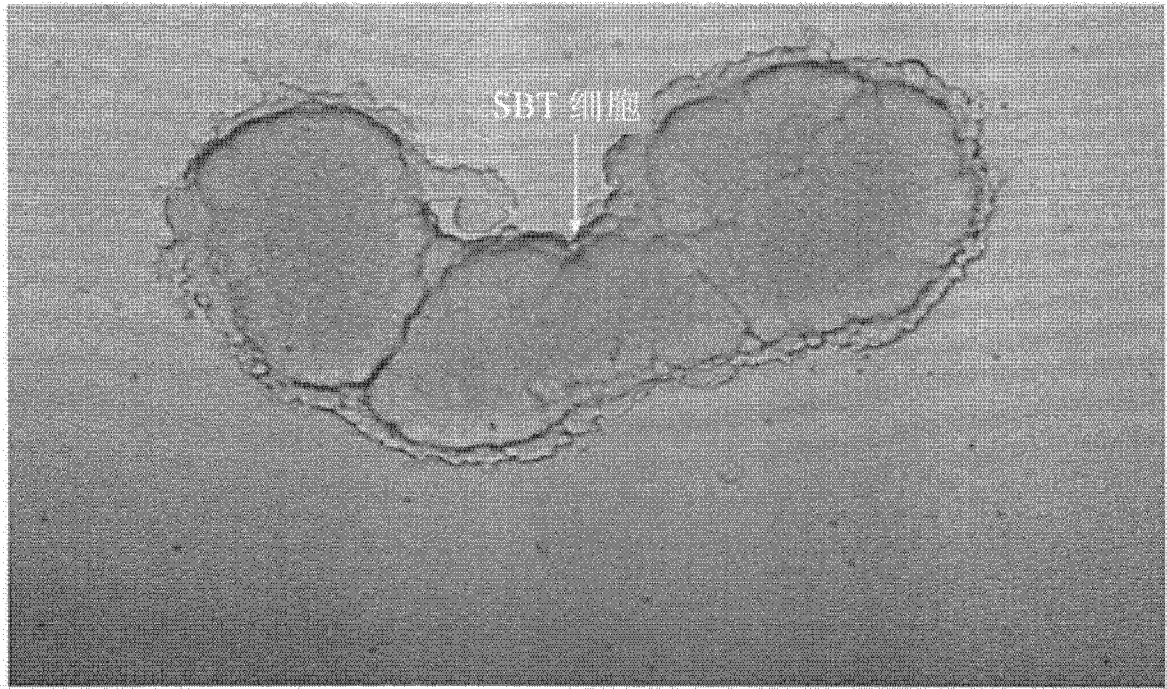
图 8

胚叶细胞-类似性干细胞(BLSCs)+转形生长因子 β (TGF- β)

400x

图 9

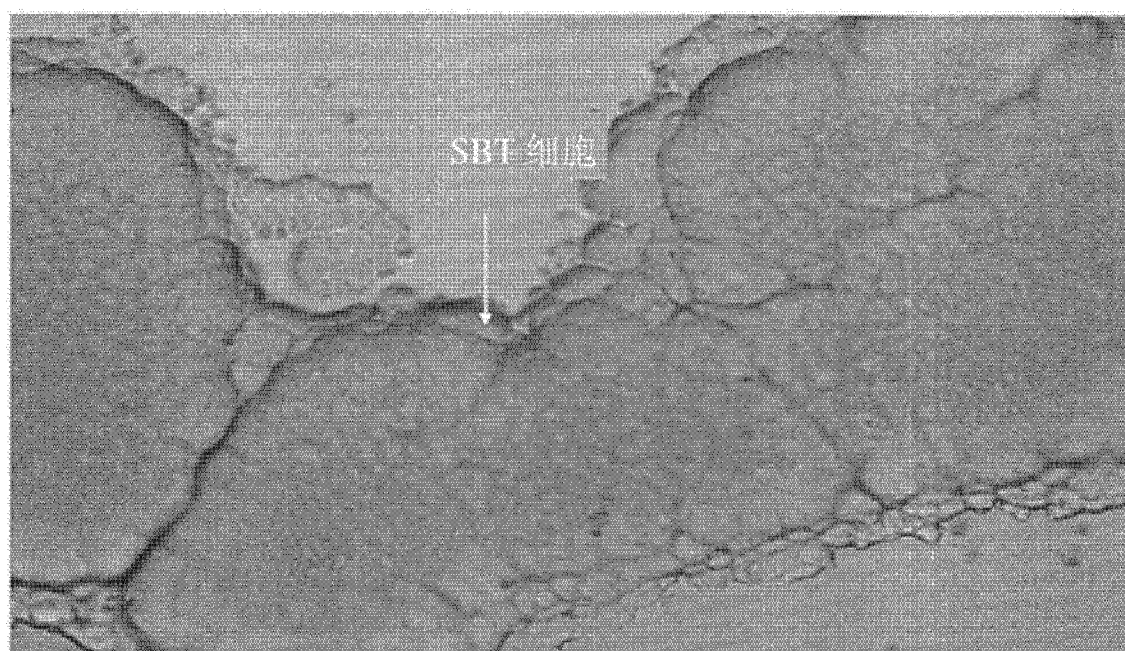
胚叶细胞-类似性干细胞(BLSCs)+转形生长因子 β (TGF- β)



100x

图 10

胚叶细胞-类似性干细胞(BLSCs)+转形生长因子 β (TGF- β)



200x

图 11

胚叶细胞-类似性干细胞(BLSCs)+转形生长因子 β (TGF- β)



图 12

SBR、SBT 及胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)之 RT-PCR 结果
于 SBR 及 SBT 中有 β 肌动蛋白及 GADPH 之 RNA 表现
于胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC)则无 β 肌动蛋白及 GADPH 之 RNA 表现



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

第一道：1Kb 标记。第二道：100bp 标记。第三道：对于 β 肌动蛋白引子之 SBR RNA。第四道：对于 β 肌动蛋白引子之 SBT RNA。第五道：对于 β 肌动蛋白引子之胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC) RNA。第六道：无 RNA，仅有 β 肌动蛋白引子。第七道：对于 GAPDH 引子之 SBR RNA。第八道：对于 GAPDH 引子之 SBT RNA。第九道：对于 GAPDH 引子之胚叶细胞-类似性干细胞(BLSC) RNA。第十道：无 RNA，仅有 GAPDH 引子

图 13