



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101835891 A

(43) 申请公布日 2010.09.15

(21) 申请号 200880025039.1

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(22) 申请日 2008.06.16

代理人 余颖

(30) 优先权数据

60/929,151 2007.06.15 US

60/929,152 2007.06.15 US

60/955,204 2007.08.10 US

60/996,093 2007.11.01 US

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.01.18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/007488 2008.06.16

(87) PCT申请的公布数据

W02008/156728 EN 2008.12.24

(71) 申请人 加内特生物治疗学股份有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 G·克朋 J·瓦格纳 V·拉加利亚

B·海姆巴赫 R·S·戈尔

权利要求书 13 页 说明书 55 页 附图 25 页

(54) 发明名称

运用体外培养增殖的自我更新型集落形成细胞治疗疾病和功能紊乱症

(57) 摘要

本发明涉及某些方法和细胞的使用,不仅广泛用于预防治疗多种疾病与功能紊乱症,而且通过运用低传代和体外广泛传代培养的自我更新型集落形成体细胞(CF-SC)亦可将其用于组织器官的修复与再生。例如,成人骨髓衍生体细胞(ABM-SC)或由其产生的复合物可单独使用,或与其他成分联用,例如,用于治疗心血管、神经学、表皮、皮肤学、牙周及免疫等方面的疾病、功能紊乱症、病理变化及损伤等。

1. 一种治疗有效量生物复合物或复合物向组织器官或受试者给药的方法,其中包括向所述器官、组织或受试者输给分离的骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞(CF-SC),其中所述CF-SC不具有多能分化能力,其中所述CF-SC具有正常的染色体组型,其中所述CF-SC为退化细胞,所述CF-SC表达CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I类抗原与 β 2-微球蛋白,所述CF-SC不表达CD10、CD34、CD45、CD62L或CD106。

2. 一种向器官、组织或受试者输给治疗有效量的生物复合物或复合物的方法,其中包括:

(a) 分离由骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞(CF-SC)的一个单独群落产生的生物复合物或复合物;和,

(b) 给所述器官、组织或所述受试者使用所述生物复合物或复合物进行治疗,其中所述CF-SC不具有多能分化能力,其中所述CF-SC具有正常的染色体组型,其中所述CF-SC为退化细胞,所述CF-SC表达CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I类抗原与 β 2-微球蛋白,其中所述CF-SC不表达CD10、CD34、CD45、CD62L或CD106。

3. 一种治疗有效量生物复合物或复合物向组织器官或受试者给药的方法,其中包括向所述器官、组织或受试者输给骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞(CF-SC)的单个群落,其中所述CF-SC不具有多能分化能力,其中所述CF-SC具有正常的染色体组型,其中所述CF-SC为退化细胞,所述CF-SC由骨髓经过下列操作步骤而获得:

i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位;和,

ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着性集落形成单位中。

4. 一种向器官、组织或受试者输给治疗有效量的生物复合物或复合物的方法,其中包括:

(a) 分离由骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞(CF-SC)的一个单独群落产生的生物复合物或复合物;和

(b) 给所述器官、组织或所述受试者使用所述生物复合物或复合物进行治疗,其中所述CF-SC不具有多能分化能力,其中所述CF-SC具有正常的染色体组型,其中所述CF-SC为退化细胞,所述CF-SC由骨髓经过下列操作步骤而获得:

i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位;和,

ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着性集落形成单位中。

5. 一种预防组织损伤、或者修复、治疗或促进受损组织再生的方法,其中包括向所述器官、组织或受试者输给骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞(CF-SC)的单个群落,其中所述CF-SC不具有多能分化能力,其中所述CF-SC具有正常的染色体组型,其中所述CF-SC为退化细胞,所述CF-SC表达CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I类抗原与 β 2-微球蛋白,所述CF-SC不表达CD10、CD34、CD45、CD62L或CD106。

6. 一种预防组织损伤、或者修复、治疗或促进受损组织再生的方法,其中包括:

(a) 分离由骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞(CF-SC)的一个单独群落产生的生物复合物或复合物;和,

(b) 给所述器官、组织或所述受试者使用所述生物复合物或复合物进行治疗,其中所述

CF-SC 不具有多能分化能力,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 表达 CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I 类抗原与 β 2- 微球蛋白,其中所述 CF-SC 不表达 CD10、CD34、CD45、CD62L 或 CD106。

7. 一种预防组织损伤、或者修复、治疗或促进受损组织再生的方法,其中包括向所述器官、组织或受试者输给骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 的单个群落,其中所述 CF-SC 不具有多能分化能力,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 由骨髓经过下列操作步骤而获得:

i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位;和,

ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着的集落形成单位中。

8. 一种预防组织损伤、或者修复、治疗或促进器官、组织或受试者受损组织再生的方法,其中包括:

(a) 分离由骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 的一个单独群落产生的生物复合物或复合物;和

(b) 给所述器官、组织或所述受试者使用所述生物复合物或复合物进行治疗,其中所述 CF-SC 不具有多能分化能力,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 由骨髓经过下列操作步骤而获得:

i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位;和,

ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着的集落形成单位中。

9. 一种治疗或降低器官、组织或受试者炎症、免疫或自身免疫活性的方法,其中包括向所述器官、组织或受试者输给分离的骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC),其中所述 CF-SC 不具有多能分化能力,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 表达 CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I 类抗原与 β 2- 微球蛋白,所述 CF-SC 不表达 CD10、CD34、CD45、CD62L 或 CD106。

10. 处理或降低器官、组织或受试者炎症活性、免疫活性或自身免疫活性的方法,其中包括:

(a) 分离由骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 的一个单独群落产生的生物复合物或复合物;和,

(b) 给所述器官、组织或所述受试者使用所述生物复合物或复合物进行治疗,其中所述 CF-SC 不具有多能分化能力,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 表达 CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I 类抗原与 β 2- 微球蛋白,其中所述 CF-SC 不表达 CD10、CD34、CD45、CD62L 或 CD106。

11. 一种治疗或降低器官、组织或受试者炎症、免疫或自身免疫活性的方法,其中包括向所述器官、组织或受试者输给骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 的单个群落,其中所述 CF-SC 不具有多能分化能力,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 由骨髓经过下列操作步骤而获得:

i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位;和,

ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着的集落形成单位中。

12. 处理或降低器官、组织或受试者炎症活性、免疫活性或自身免疫活性的方法,其中包括:

(a) 分离由骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞(CF-SC)的一个单独群落产生的生物复合物或复合物;和

(b) 给所述器官、组织或所述受试者使用所述生物复合物或复合物进行治疗,其中所述CF-SC不具有多能分化能力,其中所述CF-SC具有正常的染色体组型,其中所述CF-SC为退化细胞,所述CF-SC由骨髓经过下列操作步骤而获得:

i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位;和,

ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着的集落形成单位中。

13. 权利要求1、2、5、6、9或10任意一项的方法,所述CF-SC还表达一种或多种选自下列各组的分子:

a) CD29

b) CD59

c) CD147

d) CD166, 和,

e) 耐受性

和,其中所述CF-SC还表达一种或多种选自下列各种的分子:

f) CD11c;

g) CD14;

h) CD33;

i) CD62P;

j) CD80;

k) STRO-1;

l) HLA-II 类抗原;

m) CD178;

n) p53; 和

o) p21。

14. 权利要求3、4、7、8、11或12中任意一项的方法,其中所述低氧条件指氧气浓度为5%。

15. 权利要求3、4、7、8、11或12中任意一项的方法,其中所述低氧条件选自下列各组:

a) 氧气浓度低于约20%;

b) 氧气浓度低于约15%;

c) 氧气浓度低于约10%;

d) 氧气浓度低于约5%;

e) 氧气浓度约为1-10%;

f) 氧气浓度约为2-7%;

g) 氧气浓度约为3-6%;

h) 氧气浓度约为 4-6% ;和,

i) 氧气浓度约为 4-5%。

16. 权利要求 3、4、7、8、11 或 12 中任意一项的方法,其中所述低细胞接种密度为约少于 200 个细胞 / 平方厘米。

17. 权利要求 3、4、7、8、11 或 12 中任意一项的方法,其中所述低细胞接种密度为约少于 100 个细胞 / 平方厘米。

18. 权利要求 3、4、7、8、11 或 12 中任意一项的方法,其中所述低细胞接种密度为约少于 50 个细胞 / 平方厘米。

19. 权利要求 3、4、7、8、11 或 12 中任意一项的方法,其中所述低细胞接种密度为约少于 30 个细胞 / 平方厘米。

20. 权利要求 3、4、7、8、11 或 12 中任意一项的方法,其中所述低细胞接种浓度选自下列各组:

a) 约低于 2500 个细胞 / 平方厘米;

b) 约低于 1000 个细胞 / 平方厘米;

c) 约低于 500 个细胞 / 平方厘米。

21. 权利要求 1-20 中任意一项的方法,其中所述多能分化能力的缺乏包括抑制所述 CF-SC 分化为骨细胞。

22. 权利要求 1-20 中任意一项的方法,其中所述多能分化能力的缺乏包括在骨诱导条件下处理所述 CF-SC 后抑制所述 CF-SC 沉积可检测水平钙。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述治疗包括所述 CF-SC 暴露于含一种或多种选自下列各组成分的培养基:

a) 地塞米松;

b) 抗坏血酸盐 ;和,

c) β -甘油磷酸。

24. 权利要求 23 的方法,所述治疗还包括暴露于 Noggin。

25. 权利要求 1-20 中任意一项的方法,其中所述多能分化能力包括抑制所述 CF-SC 分化为软骨细胞。

26. 权利要求 1-20 中任意一项的方法,其中所述多能分化能力包括抑制所述 CF-SC 分化为脂肪细胞。

27. 权利要求 1-20 中任意一项的方法,其中所述 CF-SC 具有单能分化能力。

28. 权利要求 1-27 中任意一项的方法,所述 CF-SC 具有实质性自我更新能力。

29. 权利要求 1-28 中任意一项的方法,所述 CF-SC 经过体外多次细胞倍增后仍保持基本恒定的群落倍增速率。

30. 权利要求 1-29 中任意一项的方法,所述 CF-SC 不属于胚胎干细胞、造血干细胞、间质干细胞、多能成人祖细胞 (MAPCs)、多能性成人干细胞 (MASCs) 或成纤维细胞。

31. 权利要求 1-30 中任意一项的方法,所述骨髓为人骨髓。

32. 权利要求 1-31 中任意一项的方法,所述细胞群落经历了选自下列各组次数的群落倍增:

a) 至少约 15 次群落倍增;

- b) 至少约 20 次群落倍增；
- c) 至少约 25 次群落倍增；
- d) 至少约 30 次群落倍增；
- e) 至少约 35 次群落倍增；
- f) 至少约 40 次群落倍增；
- g) 至少约 45 次群落倍增；
- h) 至少约 50 次群落倍增；

33. 权利要求 1-32 中任意一项的方法,所述器官、组织或受试者为人。

34. 权利要求 1-33 中任意一项的方法,所述方法用于治疗或预防选自下列各组的细胞、器官或组织损伤、或疾病与功能紊乱症：

- a) 神经损伤、疾病或功能紊乱症；
- b) 心脏损伤、疾病或功能紊乱症；
- c) 皮肤损伤、疾病或功能紊乱症；
- d) 牙周损伤、疾病或功能紊乱症；
- e) 颌鼻甲骨损伤、疾病或功能紊乱症；
- f) 骨骼肌肉损伤、疾病或功能紊乱症；
- g) 韧带损伤、疾病或功能紊乱症；
- h) 肺部损伤、疾病或功能紊乱症；
- i) 肝脏损伤、疾病或功能紊乱症；
- j) 肾脏损伤、疾病或功能紊乱症；
- k) 泌尿生殖系统损伤、疾病或功能紊乱症；
- l) 膀胱损伤、疾病或功能紊乱症；
- m) 内分泌损伤、疾病或功能紊乱症；
- n) 造血功能损伤、疾病或功能紊乱症；
- o) 胰腺损伤、疾病或功能紊乱症；
- p) 糖尿病；
- q) 眼部损伤、疾病或功能紊乱症；
- r) 视网膜损伤、疾病或功能紊乱症；
- s) 胃肠病或功能紊乱症；
- t) 脾脏损伤、疾病或功能紊乱症；
- u) 免疫损伤、疾病或功能紊乱症；
- v) 自身免疫损伤、疾病或功能紊乱症；
- w) 炎症性损伤、疾病或功能紊乱症；
- x) 增生性损伤、疾病或功能紊乱症；和，
- y) 癌症。

35. 权利要求 5-8 中任意一项的方法,其中所述器官或组织损伤在器官或组织移植过程中得到预防。

36. 权利要求 1-35 中任意一项的方法,所述细胞为遗传修饰细胞。

37. 权利要求 36 的方法,所述细胞通过导入一个重组核酸分子得到遗传修饰。

38. 一种由一种药物可接受混合物组成的复合物,该混合物的成分为天然合成或分离的重组胞外基质或血浆蛋白与骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC),其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 表达 CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I 类抗原与 β 2-微球蛋白,其中所述 CF-SC 不表达 CD10、CD34、CD45、CD62L 或 CD106。

39. 一种由一种药物可接受混合物组成的复合物,该混合物的成分为天然合成或分离的重组胞外基质或血浆蛋白与骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 的单个群落产生的生物复合物或复合物,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 表达 CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I 类抗原与 β 2-微球蛋白,其中所述 CF-SC 不表达 CD10、CD34、CD45、CD62L 或 CD106。

40. 一种由一种药物可接受混合物组成的复合物,该混合物的成分为天然合成或分离的重组胞外基质或血浆蛋白与骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC),其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 由骨髓经过下列操作步骤而获得:

i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位;和,

ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着的集落形成单位中。

41. 一种由一种药物可接受混合物组成的复合物,该混合物的成分为天然合成或分离的重组胞外基质或血浆蛋白与由骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 单个群落产生的一种生物复合物或复合物,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 由骨髓经过下列操作步骤而获得:

i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位;和,

ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着的集落形成单位中。

42. 权利要求 38-41 中任意一项的复合物,其中所述胞外基质或血浆蛋白由一种或多种全长、或支链加工同分异构体、蛋白酶片段或选自下列各组分子的亚单位组成:

- a) 胶原蛋白;
- b) 弹力蛋白;
- c) 纤粘蛋白;
- d) 层连蛋白;
- e) 巢蛋白;
- f) 透明质酸;
- g) 聚乙醇酸 (PGA);
- h) 纤维蛋白原 (因子 I);
- i) 纤维蛋白;
- j) 凝血素 (因子 II);
- k) 凝血酶;
- l) 抗凝血酶;
- m) VIIa 的组织因子辅因子 (因子 III);

- n) 蛋白 C ;
- o) 蛋白 S ;
- p) 蛋白 Z ;
- q) 蛋白 Z 相关蛋白酶抑制剂 ;
- r) 肝素辅因子 II ;
- s) 因子 V (促凝血蛋白原, 易变因子) ;
- t) 因子 -VII ;
- u) 因子 -VIII ;
- v) 因子 -IX ;
- w) 因子 -X ;
- x) 因子 -XI ;
- y) 因子 -XII ;
- z) 因子 -XIII ;
- aa) 血管假性血友病因子 ;
- ab) 激肽释放酶原 ;
- ac) 高分子量激肽原 ;
- ad) 血浆酶原 ;
- ae) 血浆酶 ;
- af) 组织血浆酶原活化因子 ;
- ag) 尿激酶 ;
- ah) 血浆酶原活化子抑制剂 -1 ;和,
- ai) 血浆酶原活化子抑制剂 -2。

43. 权利要求 38-42 中任意一项的复合物, 还包括纯化的天然合成的或分离的重组细胞因子或趋化因子。

44. 权利要求 38 或 39 的复合物, 其中所述 CF-SC 还表达一种或多种选自下列各组的分子 :

- a) CD29 ;
- b) CD59 ;
- c) CD147 ;
- d) CD166 ;和,
- e) 末端酶。

和, 其中所述 CF-SC 还表达一种或多种选自下列各组的分子 :

- f) CD11c ;
- g) CD14 ;
- h) CD33 ;
- i) CD62P ;
- j) CD80 ;
- k) STRO-1 ;
- l) HLA-II 类抗原 ;

- m) CD178 ;
- n) p53 ;和,
- o) p21。

45. 权利要求 40 或 41 的复合物,其中所述低氧条件指氧气浓度为 5%。

46. 权利要求 40 或 41 的复合物,其中所述低氧条件氧气浓度选自下列各组:

- a) 氧气浓度低于约 20% ;
- b) 氧气浓度低于约 15% ;
- c) 氧气浓度低于约 10% ;
- d) 氧气浓度低于约 5% ;
- e) 氧气浓度约为 1-10% ;
- f) 氧气浓度约为 2-7% ;
- g) 氧气浓度约为 3-6% ;
- h) 氧气浓度约为 4-6% ;和,
- i) 氧气浓度约为 4-5%。

47. 权利要求 40 或 41 的复合物,其中所述低细胞接种密度为低于 200 个细胞 / 平方厘米。

48. 权利要求 40 或 41 的复合物,其中所述低细胞接种密度为低于 100 个细胞 / 平方厘米。

49. 权利要求 40 或 41 的复合物,其中所述低细胞接种密度为低于 50 个细胞 / 平方厘米。

50. 权利要求 40 或 41 的复合物,其中所述低细胞接种密度为低于 30 个细胞 / 平方厘米。

51. 权利要求 40 或 41 的复合物,其中所述较低细胞接种密度选自下列各组:

- a) 约低于 2500 个细胞 / 平方厘米 ;
- b) 约低于 1000 个细胞 / 平方厘米 ;和,
- c) 约低于 500 个细胞 / 平方厘米。

52. 权利要求 38-51 中任意一项的复合物,其中所述 CF-SC,具有单能分化能力。

53. 权利要求 38-52 中任意一项的复合物,所述 CF-SC 具有实质性自我更新能力。

54. 权利要求 38-53 中任意一项的方法,所述 CF-SC 经过体外多次细胞倍增后仍保持基本恒定的群落倍增速率。

55. 权利要求 38-54 中任意一项的复合物,所述 CF-SC 不属于胚胎干细胞、造血干细胞、间质干细胞、多能成人祖细胞 (MAPCs)、多能性成人干细胞 (MASCs) 或成纤维细胞。

56. 权利要求 38-55 中任意一项的方法,所述骨髓为人骨髓。

57. 权利要求 38-56 中任意一项的方法,所述细胞群落经历了选自下列各组次数的群落倍增:

- a) 至少约 15 次群落倍增 ;
- b) 至少约 20 次群落倍增 ;
- c) 至少约 25 次群落倍增 ;
- d) 至少约 30 次群落倍增 ;

- e) 至少约 35 次群落倍增；
- f) 至少约 40 次群落倍增；
- g) 至少约 45 次群落倍增；
- h) 至少约 50 次群落倍增；

58. 权利要求 38-57 中任意一项的方法，所述器官、组织或受试者为人。

59. 权利要求 38-58 中任意一项的复合物，所述方法用于治疗或预防选自下列各组的细胞、器官或组织损伤、或疾病与功能紊乱症：

- a) 神经损伤、疾病或功能紊乱症；
- b) 心脏损伤、疾病或功能紊乱症；
- c) 皮肤损伤、疾病或功能紊乱症；
- d) 牙周损伤、疾病或功能紊乱症；
- e) 颌鼻甲骨损伤、疾病或功能紊乱症；
- d) 骨骼肌肉损伤、疾病或功能紊乱症；
- x) 韧带损伤、疾病或功能紊乱症；
- e) 呼吸损伤、疾病或功能紊乱症；
- f) 肝脏损伤、疾病或功能紊乱症；
- g) 肾脏损伤、疾病或功能紊乱症；
- h) 泌尿生殖系统损伤、疾病或功能紊乱症；
- i) 膀胱损伤、疾病或功能紊乱症；
- j) 内分泌损伤、疾病或功能紊乱症；
- k) 造血功能损伤、疾病或功能紊乱症；
- l) 胰腺损伤、疾病或功能紊乱症；
- m) 糖尿病；
- n) 眼部损伤、疾病或功能紊乱症；
- o) 视网膜损伤、疾病或功能紊乱症；
- p) 胃肠病或功能紊乱症；
- q) 脾脏损伤、疾病或功能紊乱症；
- r) 免疫损伤、疾病或功能紊乱症；
- s) 自身免疫损伤、疾病或功能紊乱症；
- t) 炎症性损伤、疾病或功能紊乱症；
- u) 增生性损伤、疾病或功能紊乱症；
- v) 癌症。

60. 权利要求 38-59 中任意一项的复合物，所述细胞为遗传修饰细胞。

61. 权利要求 60 的方法，所述细胞通过导入一个重组核酸分子获得遗传修饰。

62. 权利要求 38-61 中任意一项的复合物，其中所述药物可允许混合物形成一种半固态或固态基质。

63. 一种用权利要求 38-62 中任意一项的复合物治疗组织损伤的方法，其中该复合物为液态。

64. 权利要求 63 的方法，所述液体通过注射得到应用。

65. 一种用权利要求 38-64 中任意一项的复合物治疗组织损伤的方法, 其中该复合物以液体形式涂用, 但随后形成半固体或固体基质。

66. 权利要求 1-65 中任意一项的方法或复合物, 其中所述 CF-SC 或由 CF-SC 产生的生物复合物或复合物的给药方式选自下列各组:

- a) 向受损组织内部注射;
- b) 涂抹于受损组织上;
- c) 沿近轴端向受损组织或器官注射;
- d) 沿远轴端向受损组织或器官注射;
- e) 静脉给药; 和,
- f) 器官或组织灌注。

67. 权利要求 1-66 中任意一项的方法或复合物, 其中所述 CF-SC 或由 CF-SC 产生的生物复合物或复合物抑制或减弱一种或多种选自下列各组的生物效应:

- a) 不利免疫应答;
- b) 纤维化;
- c) 不利的组织重塑;
- d) 器官或组织缺血; 和,
- e) 细胞死亡。

68. 权利要求 67 的方法或复合物, 其中所述不利免疫应答选自下列各组:

- 自身免疫应答;
- 炎症;
- 免疫细胞增殖;
- 免疫细胞活化;
- 免疫细胞脱颗粒; 和
- T 细胞介导的免疫应答。

69. 权利要求 1-68 中任意一项的方法或复合物, 所述 CF-SC 或由所述 CF-SC 产生的生物复合物或复合物刺激或增强血管生成。

70. 一种体内或体外诱导、加强和 / 或持续产生新红细胞传代的方法, 其中所述诱导、加强或保持等作用通过造血前体细胞与骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 共培养获得, 其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型, 其中所述 CF-SC 为退化细胞, 所述 CF-SC 表达 CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I 类抗原与 β 2- 微球蛋白, 其中所述 CF-SC 不表达 CD10、CD34、CD45、CD62L 或 CD106。

71. 一种体内或体外诱导、加强和 / 或持续产生新红细胞传代的方法, 其中所述诱导、加强或保持等作用通过造血前体细胞与骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 产生的一种生物复合物或复合物共培养获得, 其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型, 其中所述 CF-SC 为退化细胞, 所述 CF-SC 表达 CD13、CD44、CD49c、CD90、HLA I 类抗原与 β (beta) 2- 微球蛋白, 其中所述 CF-SC 不表达 CD10、CD34、CD45、CD62L 或 CD106。

72. 权利要求 70 或 71 的方法, 其中所述 CF-SC 还表达一种或多种选自下列各组的分子:

- a) CD29;

- b) CD59 ;
- c) CD147 ;
- d) CD166 ;和,
- e) 末端酶。

和,其中所述 CF-SC 还表达一种或多种选自下列各组的分子 :

- f) CD11c ;
- g) CD14 ;
- h) CD33 ;
- i) CD62P ;
- j) CD80 ;
- k) STRO-1 ;
- l) HLA-II 类抗原 ;
- m) CD178 ;
- n) p53 ;和,
- o) p21。

73. 一种体内或体外诱导、加强和 / 或持续产生新红细胞传代的方法,其中所述诱导、加强或保持等作用通过造血前体细胞与骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 共培养获得,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 由骨髓经过下列操作步骤获得 :

- i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位 ;和,
- ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着的集落形成单位中。

74. 一种体内或体外诱导、加强和 / 或持续产生新红细胞传代的方法,其中所述诱导、加强或保持等作用通过造血前体细胞与骨髓衍生自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 产生的生物复合物或复合物共培养获得,其中所述 CF-SC 具有正常的染色体组型,其中所述 CF-SC 为退化细胞,所述 CF-SC 由骨髓经过下列操作步骤获得 :

- i) 将骨髓细胞在低氧条件下孵育,当附着在一个组织培养处理表面时所述骨髓细胞产生附着性集落形成单位 ;和,
- ii) 以较低的接种密度将细胞转入所述附着的集落形成单位中。

75. 权利要求 73 或 74 的方法,其中所述低氧条件指氧气浓度为 5%。

76. 权利要求 73 或 74 的方法,其中所述低氧条件氧气浓度选自下列各组 :

- a) 氧气浓度低于约 20% ;
- b) 氧气浓度低于约 15% ;
- c) 氧气浓度低于约 10% ;
- d) 氧气浓度低于约 5% ;
- e) 氧气浓度约为 1-10% ;
- f) 氧气浓度约为 2-7% ;
- g) 氧气浓度约为 3-6% ;
- h) 氧气浓度约为 4-6% ;和

i) 氧气浓度约为 4-5%。

77. 权利要求 73 或 74 的方法,其中所述低细胞接种密度为低于 200 个细胞 / 平方厘米。

78. 权利要求 73 或 74 的方法,其中所述低细胞接种密度为低于 100 个细胞 / 平方厘米。

79. 权利要求 73 或 74 的方法,其中所述低细胞接种密度为低于 50 个细胞 / 平方厘米。

80. 权利要求 73 或 74 的方法,其中所述低细胞接种密度为低于 30 个细胞 / 平方厘米。

81. 权利要求 73 或 74 的方法,其中所述较低细胞接种密度选自下列各组:

a) 约低于 2500 个细胞 / 平方厘米;

b) 约低于 1000 个细胞 / 平方厘米;

c) 约低于 500 个细胞 / 平方厘米。

82. 权利要求 70-81 中任意一项的方法,其中所述 CF-SC 具有单能分化能力。

83. 权利要求 70-82 中任意一项的方法,所述 CF-SC 具有实质性自我更新能力。

84. 权利要求 70-83 中任意一项的方法,所述 CF-SC 经过体外多次细胞倍增后仍保持基本恒定的群落倍增速率。

85. 权利要求 70-84 中任意一项的方法,所述 CF-SC 不属于胚胎干细胞、造血干细胞、间质干细胞、多能成人祖细胞 (MAPCs)、多能性成人干细胞 (MASCs) 或成纤维细胞。

86. 权利要求 70-85 中任意一项的方法,所述骨髓为人骨髓。

87. 权利要求 70-86 中任意一项的方法,所述细胞群落经历了选自下列各组次数的群落倍增:

a) 至少约 15 次群落倍增;

b) 至少约 20 次群落倍增;

c) 至少约 25 次群落倍增;

d) 至少约 30 次群落倍增;

e) 至少约 35 次群落倍增;

f) 至少约 40 次群落倍增;

g) 至少约 45 次群落倍增;和,

h) 至少约 50 次群落倍增。

88. 权利要求 70-87 中任意一项的方法,所述细胞群为人。

89. 权利要求 9-12 中任意一项的方法,其中所述治疗或降低炎症、免疫或自身免疫活性导致一种或多种变化,其中选自下列各组:

a) IL-13 病灶或全身水平下降;

b) TNF- α 病灶或全身水平下降;

c) IL-2 病灶或全身水平升高;

d) 病灶或全身免疫细胞增殖作用下降;

e) 病灶或全身免疫细胞活化作用下降;

f) 病灶或全身免疫细胞降解作用下降;

90. 权利要求 89 的方法,其中所述免疫细胞增殖下降包括一种或多种选自下列各组类型细胞的增殖受到抑制:

- a) 单核细胞；
- b) 粒细胞；
- c) 淋巴细胞；和，
- d) 中性粒细胞。

91. 权利要求 89 的方法，其中所述 IL-2 病灶或全身水平升高促进 T 调节细胞的成熟。

92. 权利要求 1-91 中任意一项的方法或复合物，其中所述生物复合物或复合物为冻干产品。

93. 权利要求 1-91 中任意一项的方法或复合物，其中所述生物复合物或复合物在低温下保存。

94. 权利要求 1-91 中任意一项的方法或复合物，其中所述生物复合物或复合物与一种或多种药物可接受载体混合。

运用体外培养增殖的自我更新型集落形成细胞治疗疾病和功能紊乱症

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请书遵照《美国临时专利申请》第 60/929, 151 号与第 60/929, 152 号文件（各文件于 2007 年 6 月 15 日归档）、《美国临时专利申请》第 60/955, 204 号文件（于 2007 年 8 月 10 日归档）和《美国临时专利申请》第 60/996, 093 号文件（于 2007 年 11 月 1 日归档）的 § 119(e)35 U. S. C. 主张权益。上述引用的各个专利申请文件在此一并归入本申请书的参考文献中。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明主要涉及体外培养的自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 和其产生组分的形成, 以及在治疗多种疾病和功能紊乱症方面的应用。此类 CF-SC 的一个例子表现为成年人的骨髓衍生体细胞 (hABM-SC)。

[0005] 本发明亦涉及 CF-SC 细胞群落在培养过程中的相关操作技术, 该操作用于调节（即上调或下调）经由体外培养的自我更新型集落形成细胞产生的各种可溶性或分泌组分的合成水平。

[0006] 本发明的技术领域还涵盖细胞与组织工程疗法, 尤其是运用和 / 或输用 CF-SC 或由此种细胞产生的组分方法, 其中包括通过将其连于药物可接受载体（例如, 药物可接受溶液或瞬时、永久或可生物降解的基质）中或与这种载体混合进行给药的方法。

[0007] 细胞疗法

[0008] 运用细胞疗法时有两种处理治疗急慢性组织损伤的方法可供选择, 其总目标在于受损组织功能和 / 或形态的恢复这些基于细胞治疗的选择包括: 1) 细胞置换——通过建立长期移植运用培养的细胞置换受损组织; 和 2) 提供营养因子——运用培养的细胞及其产生的物质（例如生长因子）通过未经长期移植的细胞衍生或产生的因子释放刺激内源性修复机制。

[0009] 本发明涉及不依赖于长期细胞移植的细胞疗法的应用。特别强调的是, 本发明涉及细胞及其产生的组分在治疗多种疾病和功能紊乱症, 尤其是涉及自我更新能力有限的细胞与组织（如神经与心脏组织器官）疾病中的应用。

[0010] 可供选择的处理治疗组织损伤的细胞疗法也未排除使用自体或同种异体细胞的可能性。以上各种方法均具有一定的优点与缺点。自体细胞的运用与下列因素或参数有关:

[0011] • 患者为供体;

[0012] • 需要以患者为基础逐个生产不同的细胞产品。

[0013] • 细胞产品的相似性、纯度和效能等变量; 和

[0014] • 从临床治疗决定到获得移植细胞之间的间隔时间。

[0015] 相反, 同种异体细胞的运用与下列因素或参数有关:

[0016] • 供体为第二方（即患者不作为供体）;

[0017] • 与供体变量有关的风险;

[0018] • 生产的每一批次细胞产品可用于治疗多位患者；

[0019] • 细胞产品的相似性、纯度和效能等变量的一致性增加；和

[0020] • 从临床治疗决定到获得移植细胞之间的间隔时间缩短。

[0021] 本发明主要涉及与同种异体细胞运用有关的治疗。然而，运用同种异体细胞进行相同治疗的可能性是均等的。

[0022] 器官与组织修复

[0023] 几个世纪以来，人们早已认识到，哺乳动物体内某些组织具有潜在的再生性，例如，类似皮肤与骨骼这样的组织已被公认具有在遭受损伤后进行自我修复的功能。然而，中枢神经系统（即大脑与脊髓）、外周神经系统和心脏大量功能障碍与疾病却给人类带来负面影响，因为这些特化的组织缺乏再生能力。这些功能障碍与疾病包括，例如，脊髓损伤、肌萎缩侧索硬化症（ALS）、帕金森症、中风、亨丁顿舞蹈症、脑外伤、脑瘤、Fabry 病、心脏病（例如阻塞性心衰竭与心肌梗塞）等。例如，临床治疗策略往往只强调对后续病变或损伤的预防，而忽略了对受损组织（例如，神经元、神经胶质细胞、心肌细胞）的置换或者修复，这些策略包括用外源性类固醇及非细胞型合成药物治疗，并且其治疗的成功率因类固醇或者合成药物能否继续给药而有所不同。

[0024] 例如，大多数脊髓损伤属于压缩损伤，其余病例则涉及脊髓横切。针对脊髓损伤的现有疗效治疗包括，利用外科与非外科手术进行机械固定并通过使用类固醇疗法抑制炎症反应发生来防止脊髓的进一步损伤。

[0025] 此外，组织老化几乎对每种影响哺乳动物的常见疾病都是主要的负面因素，它也是许多组织在衰退过程中的一个主要特征，其中包括皮肤、骨骼、眼部、大脑、肝脏、肾脏、心脏、血管、肌肉等。而且，我们知道，机体某些组织已经具备的有限再生能力随着年龄增长而降低，在整个生命过程中几乎每种组织的功能维持及修复机制均在逐渐衰退。

[0026] 因此，有必要开发新型、先进且有效的治疗人类疾病及功能障碍的方法，尤其是治疗神经与心脏疾病及年龄相关性功能衰退症的方法。

[0027] 红细胞生成

[0028] 健康人体或其他哺乳动物体内造血细胞通常不具备有限的长期自我更新能力。但是，结合供者供血的有限性，大量失血（或者需要其他途径的血液补充）的潜在危险使得对体外高水平供应、持续供应或产生红细胞技术的需求格外强烈。血液是一种高度特化的循环组织，由悬浮在液体介质即血浆中的几种细胞组成。其细胞组成如下：红细胞，可携带呼吸气体，因含血红蛋白（一种可结合肺中氧气并将其运输至体内其他组织的含铁蛋白质）呈红色而得名；白细胞，具有抗病功能；血小板，为细胞片段，在凝血中发挥重要功能。与血液有关的医学术语常以 hemo 或者 hemato（有的用 haemo 或 haemato）开头，这些词缀来源于希腊词语“haima”，意为“血液”。血细胞在骨髓中产生，其过程称之为“造血”。血细胞由脾脏和肝脏降解。健康红细胞的半衰期为 120 天，与血浆的一样，然后老红细胞被造血产生的新红细胞全部取代。输血是最常见的血液疗法。输血通常用人作为供者。由于血型不同，输血血型不相配可能引起严重的并发症，交叉配型可用于确保输血的血型相配。

[0029] 在全球范围内，治疗患者常见的问题之一就是缺乏献血者和输血所用的红细胞。相应地，就产生了对新型改良高效产生红细胞技术的需求，因为这种技术至少在一定程度上可缓解全球范围内红细胞供应缺乏的问题。

[0030] 皮肤

[0031] 本发明在某种程度上涉及对皮肤创面的治疗。目前已有许多治疗皮肤创面的不同方法,例如表皮置换产品、真皮置换产品、人工皮肤产品和创面用敷料。以下是上述产品的某些例子的简述。

[0032] 表皮置换产品

[0033] 根据生产商介绍,EPICEL™(美国马萨诸塞剑桥的 Genzyme 公司)由自体皮肤表皮细胞组成,这些细胞来源于患者自己的活体皮肤,用于治疗皮肤烫伤。细胞与小鼠饲养细胞系共培养形成自体表皮层。

[0034] 根据生产商的介绍,MYSKIN™(英国 Sheffield,S1 4DP 的 CellTran 公司)为培养的自体表皮替代物,用于治疗烫伤、溃疡和其他非愈合性创面。MYSKIN™ 包含由患者自身组织增殖而来的活细胞。MYSKIN™ 由一层生长在高聚合物样涂层上的角质细胞(表皮细胞)组成,该涂层有助于细胞向创面的转移,并在创面处启动伤口愈合。MYSKIN™ 运用一个医疗级硅底物层支持细胞转运、创面覆盖,并对渗出物进行处理。

[0035] 根据生产商的介绍,EPIDEX™(瑞士 Lausanne 的 Modex Therapeutics 公司)为自体皮肤表皮取代物,由直接取自进行非外科手术患者头发衍生的干细胞与前体细胞生长而成。

[0036] 根据生产商的介绍,CELLSPRAY™(英国 Cambridge CB2 1NL 的 Clinical CellCulture Europe 公司)为培养的自体移植表皮悬浮细胞,这些细胞被喷洒到受损皮肤上,以便快速形成一个表皮覆盖层,促进伤口愈合并优化伤疤形态。

[0037] 表真皮置换产品

[0038] 根据生产商的介绍,INTEGRA™ Dermal Regeneration Template 真皮再生模板(美国新泽西州 Plainsboro 的 Integra LifeSciences 公司)为一个可置换皮肤的双层膜系统。真皮置换层由交联牛肌腱胶原蛋白形成的多孔纤维基质和粘多糖(6-磺酸-软骨素)组成,其中粘多糖具有可控多孔性和确定的降解速率。临时表皮底物层由合成聚合物多聚硅烷和控制创面湿度丧失的功能因子组成。胶原真皮置换层可作为一种基质,供成纤维细胞、巨噬细胞、淋巴细胞以及由创面床衍生的毛细血管的浸润。

[0039] 根据生产商的介绍,DERMAGRAFT™(美国加州 La Jolla 的 AdvancedBiohealing 公司)为生长在可降解筛状骨架上的同种异体新生儿成纤维细胞,其治疗的适应症为全厚度糖尿病溃疡。

[0040] 根据生产商的介绍,PERMACOL™(美国马萨诸塞州 Andover 的 Tissue ScienceLaboratories 公司,邮编:01810)Permacol™ 外科移植物为由猪真皮衍生的胶原层细胞,植入人体内不会引起变态反应,且能长久存活。

[0041] 根据生产商的介绍,TRANSCYTE™(美国加州 La Jolla 的 AdvancedBiohealing,邮编:92037)TRANSCYTE™ 为一种人前额衍生成纤维细胞临时皮肤替代物(同种异体移植物)。该产品由聚合物膜和于尼龙网上体外无菌条件下培养的新生儿成纤维细胞组成。细胞生长之前,该尼龙网用猪真皮胶原层包被,然后固定于聚合物膜上进行培养。当将该产品用于治疗烫伤时此膜就会形成一种透明的合成表皮。人成纤维细胞衍生临时皮肤取代物提供一种临时保护屏障。TRANSCYTE™ 具有一定的透明度可直接观察监测创面床的变化。

[0042] 根据生产商的介绍,RENGRANEX™ Gel(Ortho-McNeil Pharmaceutical 公司 ©

ETHICON 公司) 为一种局部创面护理产品, 由重组 PDGF 包被在凝胶中制成。

[0043] 人工皮肤产品(表皮与真皮组合产品)

[0044] 根据生产商的介绍, PERMADERM™(美国马里兰州 Walkersville 的 CambrexBio Science Walkersville 公司) 由同种异体皮肤的表皮与真皮层构成, 治疗的适应症为重度烫伤。据报道, 本产品易弯曲, 可与患者相容性生长。

[0045] 根据生产商的介绍 ORCEL™(美国纽约州纽约 Ortec International 公司) 双层结构由同种异体表皮细胞和在牛胶原层中培养的成纤维细胞构成, 其适于治疗的适应症为刃厚皮烫伤症。生产商报道称, 在用产品治疗 2 或 3 周的两例患者中未检测到本产品有关的 DNA。

[0046] 根据生产商的介绍, APLIGRAF™(英国伦敦 WC2N 6LA 的 Smith & Nephew 公司) 为培养于牛胶原层中的同种异体表皮细胞和成纤维细胞, 其治疗适应症为静脉性下肢溃疡。

[0047] 创面用敷料

[0048] 根据生产商的介绍, 3M™ TEGADERM™ 透明膜敷料(美国明尼苏达州 St. Paul 的 3M 公司) 为可呼吸薄膜。可形成一个阻隔细菌与病毒等外部污染物的保护屏障。

[0049] 根据生产商的介绍, TISSEEL™ VH Fibrin Sealant(美国伊利诺斯州 Deerfield 的 Baxter 公司) 可作为辅助剂用于止血。

发明摘要

[0050] 本发明涉及稳定细胞群落及其产生成分的生产及运用。此处所用的“稳定细胞群落”一词意为分离到的、体外培养的细胞群落, 当将其导入哺乳动物活体(如小鼠、大鼠、人、狗、牛等) 中时, 已经分化为特化细胞或其它类型细胞(入软骨细胞、脂肪细胞、骨细胞等等) 的代谢产物无法检测到, 细胞群落中的细胞表达至少一种具治疗作用成分(如膜结合物或者可溶性 TNF- α 受体、IL-1R 拮抗剂、IL-18 拮抗剂、表 1A、1B、1C 中列出的成分等等) 至可检测水平、或维持这种表达或诱导表达的能力。

[0051] 本发明提及的该稳定细胞群落的另一特征为, 这些细胞不表现异位分化。“异位”一词意为“在错误的地方”或“位置不合适”。“异位”的英文词来源于希腊语“ektopis”, 意为“换位”(“ek”表示“出”, “topos”表示“地方”, 合起来意为“出位”)。例如, 异位肾指的是肾不在通常的位置, 或者宫外孕即为“异位怀孕”。在本文中, “异位分化”指的是, 当细胞导入心脏组织时产生了组织样钙化和/或骨化。已经证实, 当将间质干细胞注射进心脏组织时此现象就会发生。参见文献: Breitbach 等, “骨髓细胞植入梗塞心脏组织的潜在危险”, 《血液》, 第 110 卷第 4 期(2007 年 8 月)。

[0052] 本发明涉及体外培养的自我更新型集落形成体细胞(CF-SC) 和产生组分的形成及在治疗多种疾病和功能紊乱症方面的应用。此外, 本发明亦涉及体外继代培养增殖的自我更新型集落形成体细胞(下文简称为“exCF-SC”) 及其产生组分的形成及在治疗多种疾病和功能紊乱症方面的应用。ExCF-SC 属于自我更新型集落进行体细胞(CF-SC), 在体外培养中可进行至少约 30 次、40 次或 50 次细胞分裂的细胞群落。因此, 体外增殖的自我更新型集落进行细胞(以下简称为 CF-SC)(除非另有特殊规定, 此术语指已经进行不到 30 次群落细胞分裂(如少于 5 次、少于 10 次、少于 15 次、少于 20 次、少于 25 次群落细胞分裂) 的细胞群落, 又指已经在体外进行多于约 30 次、多于约 40 次或多于约 50 次群落细胞分裂的细

胞群落)。CF-SC 的一个特殊例子即为成年人的骨髓衍生体细胞(以下简称为“ABM-SC”)。此外,exCF-SC 的一个特殊例子为在体外培养中已经进行至少约 30 次、40 次或 50 次群落细胞分裂的成年人骨髓衍生体细胞(以下简称为“exABM-SC”)。相应地,除非另有特殊规定,术语“ABM-SC”既指已经进行了不到 30 次群落细胞分裂(如少于 5 次、少于 10 次、少于 15 次、少于 20 次、少于 25 次群落细胞分裂)的 ABM-SC 细胞群落,又指已经在体外进行多于约 30 次、多于约 40 次或多于约 50 次细胞群落分裂的 ABM-SC 细胞群落)。

[0053] 本文使用的术语“继代增殖培养”指的是已经进行了至少约 30 次或更多次细胞分裂的细胞群落,这些细胞为非衰老、非退化的细胞,并且能持续保持正常的染色体组型,在原代细胞种群中存在这种染色体组型。

[0054] 本文中运用的术语“实际自我更新能力”指的是具有可经历大量细胞分裂周期产生多代细胞的能力(因此,每次细胞分裂,一个细胞可产生两个“姊妹”细胞,至少有一个姊妹细胞可继续进行细胞分裂)。“实际自我更新能力”的一种测量指标为一个细胞群落进行至少约 10、15、20、25、30、35、40、45、50 次或更多此细胞分裂的能力。“实际自我更新能力”的另一种测量指标为一个细胞群落在细胞培养开始之后在组织培养容器中维持重新分布或聚集能力的程度(在维持相同或相似的培养条件下)。因此,当一个群落在细胞培养倍增早期细胞重新分布所需时间的 25%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 100% 时间段内继续重新分布于组织培养容器时,则可证实“实际自我更新能力”(例如,细胞群落在经历 10 倍以上的群落增长之前)。“实际自我更新能力”的另一种测量指标为维持群落细胞分裂时间或者恒定的、相对快速的群落细胞分裂的恒定速率的能力。本文中运用的术语“实质性非多能性分化能力”指的是在体内或体外无法分化为不同多功能细胞类型的细胞群落。造血干细胞即为真正具有实际多能性分化能力细胞的一个例子,其在体外或体内均可分化为红细胞、T 细胞、B 细胞、血小板等功能性细胞。间质干细胞是真正具有实际多能性分化能力细胞的另一个例子,例如,它可分化为骨细胞(骨)、脂肪细胞(脂肪)或者软骨细胞(软骨)。相反,细胞群落中具有“实质性非多能性分化能力”的细胞在体外或当将其导入机体内或体内靶组织中时不能分化为多种细胞类型。在本发明的一个优先实例中,具有“实质性非多能性分化能力”的一个细胞群落中至少有约 80%、90%、95%、98%、99% 或 100% 细胞未检测到在体外或体内能够被诱导分化为多种类型的细胞。一个具有“实质性非多能性分化能力”的细胞例子即为“单能性”细胞或“单能性祖细胞”。

[0055] 本文使用的术语“干细胞”指的是具有下列两种特性的细胞或细胞群落。1) 自我更新能力,指的是经历无数细胞分裂周期仍然维持未分化状态的能力;和 2) 分化能力,指的是转变为一种或更多种成熟细胞类型的能力,这种转变一旦形成,则不可再进行细胞分裂(例如,转变为骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等功能性细胞的能力)。本文中所指的分化能力意为细胞属于具有全能性、极多能性、多能性或单能性的祖细胞。“间质干细胞”为具有相同定义的干细胞,但此处所提及的细胞由间质组织(如骨髓、脂肪或软骨)衍生而来或直接由其获得。参见文献:Horwitz 等,“MSC 命名法阐释”。国际细胞治疗学会职位声明,《细胞治疗》,第 7 卷第 5 期。P393-395(2005);以及文中所引用的文献。

[0056] 本文使用的术语“全能性”指的是可转变为原机体内任何发育阶段出现的任何一种细胞类型的细胞。典型的全能细胞由受精卵(即卵细胞与精子结合所形成的细胞)的最初几次分裂产生。因此,全能性细胞能够分化为胚胎及胚胎外细胞。

[0057] 本文使用的“极多能性”指的是细胞能够分化为衍生自三种胚层（内胚层、中胚层和外胚层）任意一种的细胞，分化的细胞在原供体生物体中也存在。

[0058] 本文使用的“多能性”指的是细胞能够产生多种类型（即多于一种类型）的分化细胞。间质干细胞即为一种多能性细胞。

[0059] 本文使用的“单能性”指的是细胞只能够产生一种细胞类型。单能性细胞具有自我更新能力，但却只能转变为一种类型的成熟细胞。

[0060] 本文使用的术语“正常染色体组型”指的是染色体数目正常、具有供体物种中存在的正常染色体典型结构的遗传物质组成。

[0061] 本文使用的术语“结缔组织”属于通常传统分类引用的四种组织（其他组织为表皮组织、肌肉组织和神经组织）之一。结缔组织涉及机体及器官本身结构与支持结构，通常由中胚层衍生而来。本文使用的“结缔组织”包括有时被称作“结缔组织支持物”、“特化的结缔组织”以及“胚胎结缔组织”的组织。

[0062] “结缔组织支持物”包括网状（或疏松）结缔组织支持器官和上皮组织位于适当的位置，具有大量包括胶原蛋白和弹力蛋白在内的蛋白纤维。结缔组织支持物亦包括致密结缔组织（或者称作纤维结缔组织），其可形成韧带和肌腱。

[0063] “特化结缔组织”包括血液、骨骼、软骨、脂肪和网状结缔组织。网状结缔组织属于网状纤维（超细 III 型胶原纤维）组织，可形成支持淋巴器官（淋巴结、骨髓与脾脏）的软骨。

[0064] “胚胎结缔组织”包括间质结缔组织和粘膜结缔组织。间质组织（亦称之为胚胎结缔组织）为主要发育自胚胎中胚层（三层胚芽盘的中间层）组织的总称。具有粘性形成一定稠度的间质组织包含胶原纤维束和成纤维细胞。间质组织随后分化为血管、血液相关组织以及结缔组织。粘膜结缔组织（粘膜组织）为一种在胎儿发育期出现的结缔组织，其极易被鉴定为脐带胶质（脐带内一种明胶样物质，在脐带内具有保护并阻隔细胞的作用）的一种组分。

[0065] 本文使用的术语“非衰退”指的是能够在体外进行无限细胞分裂的细胞或细胞系。非衰退细胞通过遗传改变获得这种能力，消除或超越了细胞持续分裂能力的极限。相反，“衰退细胞”为真核细胞，如果直接取自机体并在体外培养（产生“初级细胞培养”），则会在衰老（丧失细胞分裂能力）及死亡前进行有限数量的细胞分裂。例如，大多数哺乳动物衰退细胞的初级培养通常可在分化、衰老或死亡之前进行相对确定但分裂能力有限的细胞分裂（取决于初级细胞的类型）。

[0066] 本文使用的“长期移植”意为在自细胞被输入体内起历时 4 周以上仍可检测到供体细胞在整个（或部分）靶组织内定植，且供体细胞被转运。“4 周以上”包括 5、6、7、8、10、12、14、16、18、20 和 24 周以上的时间段。“4 周以上”包括 6 个月、8 个月、10 个月、12 个月、18 个月、24 个月、30 个月、36 个月、42 个月和 48 个月以上的时间段。

[0067] 本发明亦涉及 CF-SC 与 exCF-SC 细胞群落在培养过程中的相关操作技术，该操作用于调节（即上调或下调）经由体外培养的自我更新型集落形成细胞产生的各种可溶性或分泌组分的合成水平。

[0068] 本发明亦涉及继代培养增殖的细胞群落，其特征为分化为骨细胞的能力丧失。例如，本发明涉及继代培养增殖的细胞群落，其特征为，在骨诱导条件下培养（包括加骨成形

素 Noggin 或不加骨形成素条件下培养) 时形成钙沉积的能力丧失 (见实例 16)。(小鼠与人类 Noggin : 见文献 : 例如,《美国国家生物技术中心 PubMed 蛋白数据库》序列号 NP_032737 和 NP_005441 (分别), 又见文献 : 例如, Valenzuela 等, “哺乳动物 Noggin 鉴定及其在成年人神经系统中的表达”, 《神经科学杂志》, 15 (9), 6077-6084 (1995))。

[0069] 本发明亦涉及继代培养增殖的细胞群落, 其特征为分化为骨细胞的能力丧失和 / 或形成钙沉积的能力丧失 (如前所述), 但此处所提及的细胞群落仍继续分泌或仍维持分泌或诱导分泌至少一种治疗活性成分。

[0070] 本发明的技术领域还涵盖细胞和组织工程疗法, 尤其体现在运用和 / 或输用 CF-SC 和 exCF-SC 或由此种细胞产生的组分的方法方面, 其中包括通过将其连于药物可接受载体 (例如, 药物可接受溶液或瞬时、永久或可生物降解的基质) 中或与这种载体混合进行给药的方法。

[0071] 本发明亦涉及增值培养 (即体外培养及运输) 和继代增殖培养的细胞群落, 最好为 STRO-1 细胞表面标记物表达为阴性的细胞群落。见文献 : 例如, Stewart 等, “作为原始骨髓基质细胞及其分化的子代细胞标记物的 STRO-1、HOP-26 (CD63)、CD49a 和 SB-10 (CD166) : 体外比较研究”。《细胞组织研究》2003 年 9 月 ; 313 (3) : 281-90 ; 和 Dennis 等, “STRO-1+ 骨髓细胞群落具有多能性” 《细胞组织器官》2002 ; 170 (2-3) : 73-82 ; 和 Oyajobi 等, “运用 STRO-1 单克隆抗体从胎儿骨髓基质通过免疫选择分离人集落性成骨细胞祖细胞及定性研究” 《骨无机成分研究杂志》1999 年 3 月 ; 14 (3) : 351-61。

[0072] 本发明亦涉及包含 CF-SC 和 exCF-SC (例如 ABM-SC 与 exABM-SC) 的药物可接受成分的生产与运用, 其中 CF-SC 和 exCF-SC 具有附加结构和 / 或治疗成分。作为例子, CF-SC 或 exCF-SC (例如 ABM-SC 或 exABM-SC) 可与胶原蛋白组合形成一种药物可接受溶液, 产生液体、半固体或固体成分 (基质), 以用于治疗、修复皮肤功能紊乱症 (例如, 皮肤创伤如烫伤、擦伤、撕裂、溃疡、感染), 进而再生新皮肤。

[0073] 本发明一般涉及自我更新细胞的应用, 此处的自我更新细胞指的是集落形成体细胞 (CF-SC), 其中包括生成后再运输的集落形成体细胞 (exCF-SC)。此类细胞的例子为成年人的骨髓衍生体细胞 (ABM-SC), 其中包括生成后再运输的成年人骨髓衍生体细胞 (exABM-SC), 用于治疗多种疾病及功能紊乱症, 尤其是涉及贫血、创伤和 / 或炎症 (例如, 由急性心肌梗塞 (AMI) 引起的心脏衰竭和中风) 的疾病及功能紊乱症。

[0074] 自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC), 如本发明使用的成年人骨髓衍生体细胞 (ABM-SC), 按以下专利所述方法制备, 如美国专利公开号 20030059414 (美国专利申请号 09/960, 244, 2001 年 9 月 21 日归档) 和美国专利公开号 20040058412 (美国专利申请号 10/251, 685, 2002 年 9 月 20 日归档)。上述引用的各个专利申请文件在此一并归入本申请书的参考文献中。

[0075] 需要特别说明的是, 分离自原细胞群落的 CF-SC (例如, 来自骨髓、脂肪、皮肤、胎盘、肌肉、脐带或者结缔组织) 在低浓度氧条件下 (如空气稀薄) 培养并以低密度进行运输, 结果可使 CF-SC 经过多次细胞分裂之后仍维持必需恒定的群落细胞分裂速率。CF-SC 增殖到一定数量之后, CF-SC 则可用于产生本发明的治疗成分。例如, CF-SC 经过至少约 30 次、40 次或 50 次细胞分裂增殖之后, exCF-SC 可用于产生本发明的治疗成分。例如, 本发明所使用的 CF-SC 与 exCF-SC 衍生自骨髓 (此处分别指的是 ABM-SC 和 exABM-SC)。

[0076] 正如本发明中使用的一样, CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 的一个实例为分离的细胞群落, 此细胞群落中的细胞共表达 CD49c 和 CD90, 而且该细胞群落在经历了至少约 30 次、40 次或 50 次细胞群落分裂之后仍保持不到 30 小时分裂一次的分裂速率。

[0077] 正如本发明中使用的一样, CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 的另一实例为分离的细胞群落, 此细胞群落中的细胞共表达 CD49c、CD90 和筛选自含 CD44、HLA-I 类抗原和 β -2 微球蛋白实验组的一种或更多种细胞表面蛋白, 而且该细胞群落在经历了至少约 30 次、40 次或 50 次细胞群落分裂之后仍保持不到 30 小时分裂一次的分裂速率。

[0078] 正如本发明中使用的一样, CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 的另一实例为分离的细胞群落, 此细胞群落中的细胞共表达 CD49c 和 CD90, 但不表达细胞表面蛋白 CD10, 而且该细胞群落在经历了至少约 30 次、40 次或 50 次细胞群落分裂之后仍保持不到 30 小时分裂一次的分裂速率。

[0079] 正如本发明中使用的一样, CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 的另一实例为分离的细胞群落, 此细胞群落中的细胞共表达 CD49c、CD90 和筛选自含 CD44、HLA-I 类抗原和 β -2 微球蛋白实验组的一种或更多种细胞表面蛋白, 但不表达细胞表面蛋白 CD10, 而且该细胞群落在经历了至少约 30 次、40 次或 50 次细胞群落分裂之后仍保持不到 30 小时分裂一次的分裂速率。正如本发明中使用的一样, CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 的另一实例为分离的细胞群落, 此细胞群落中的细胞表达筛选自含表 1A、1B 和 1C 中所示的可溶性蛋白实验组的一种或更多种细胞表面蛋白, 而且该细胞群落在经历了至少约 30 次、40 次或 50 次细胞群落分裂之后仍保持不到 30 小时分裂一次的分裂速率。

[0080] 组织器官损伤可由, 例如, 疾病 (例如, 可遗传 (遗传) 病或感染病 (例如细菌、病毒和真菌感染))、机械创伤 (如烫伤、撕裂、压迫或侵入组织以及器官损伤)、缺血、衰老、有毒化学品暴露、离子辐射以及免疫系统失调 (例如自身免疫功能障碍) 引起。

[0081] 本发明包括下列成分的应用: CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC)、少量 CF-SC 与 exCF-SC 纯化蛋白、CF-SC 与 exCF-SC 条件培养基上清液、CF-SC 与 exCF-SC 条件培养基培养的少量悬浮细胞。在本发明的一个实例中, 上述成分可与生理相容性生物降解基质组合, 或引入该基质中, 此基质含有附加成分, 如胶原蛋白和 / 或纤维素 (例如, 天然纯化或重组人、牛或猪胶原蛋白或纤维素)、聚乙二醇酸 (PGA) 和 / 或附加结构或治疗成分。上述混合基质可用于组织或器官损伤部位, 以便促进、增强和 / 或导致受损组织或器官的修复和 / 或再生。

[0082] 本发明的实例包括 CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 的应用, 其与可以液态、半固态或固态方式给药的药物可接受成分相连。本发明的实例可通过相关领域技术人员日常使用的方法给药, 例如, 像喷洒或将组分气溶胶化等局部涂用法、注射和移植等方法。

[0083] 与之前介绍的组织再生治疗及产品相比, 本发明中所述的、可用于组织再生治疗的 CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 以及由这些细胞产生的细胞和成分的使用具有很大的优势。例如, CF-SC 与 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 以及由这些细胞产生的细胞和成分的使用提供一种组织再生治疗的方法, 其具有不良免疫应答 (如炎症发病率降低, 活化的 T 细胞减少, 例如实例 3A、3B、5、18 和 19) 发生率降低。并且, 由于 ABM-SC

和 exABM-SC 属于免疫沉默细胞,故受试者不必进行 HLA 配型或者治疗前进行预处理。请参见第二部分实例 10,以及图 17。

[0084] 本发明亦涉及 CF-SC 和 exCF-S (例如增殖培养和继代增殖培养的成人骨髓衍生体细胞 (人体 ABM-SC 和 exABM-SC)) 及其产生的细胞产物在诱导、增强和 / 或维持造血功能 (尤其是用于在被称作红细胞生成这一生理过程中从造血祖细胞体外生成红细胞) 中的应用。因此,本发明的另一实例包括此类细胞和 / 或由其产生的成分在诱导、增强和 / 或维持生成红细胞功能中的应用。

[0085] 本发明技术领域的另一实例涉及通过应用上述细胞、细胞群落及其产生的组分防治免疫病、自身免疫性疾病及炎症。

[0086] 在另一实例中,本发明提供修复皮肤 (即表皮、真皮和皮下组织) 创面并使其再生的治疗成分和方法,其中包括液态、半固态和固态基质的生产和应用,CF-SC 与 exCF-SC (例如,人体 ABM-SC 和 exABM-SC)、或者这些细胞的产物、以及附加结构或治疗成分可与该基质相连。

[0087] 临床前研究的典型结果

[0088] 体内临床前药理学研究已经证实,ABM-SC 在治疗心肌梗塞和中风方面有很多优点。例如,在一项考察大鼠心肌梗塞模型中,心脏内注射 hABM-SC 效果 (尤其是确定 hABM-SC 在恢复 AMI (急性心肌梗塞) 后心脏功能恢复中的作用,及评价 hABM-SC 的分布和清除的研究中),结果显示, hABM-SC 对心脏功能的改善具有显著作用,并可明显降低纤维症的发生。而且,心脏注射后四周在心脏内未发现有 hABM-SC 存留,注射后 8 周也未在外周期关中检测到 hABM-SC。相应地,在一项考察 AMI 猪模型中,猪与人体 ABM-SC 安全性与疗效的研究 (尤其是评价通过 MYOSTAR™ 导管经皮 NOGA™ 导引心肌内细胞内给药的可行性、安全性及疗效) 中,结果证实,特殊的输送方法其耐受性大,并显著改善心脏功能参数。与此类似,在一项 hABM-SC 输送方法与中风恢复的比较研究 (尤其是确定 hABM-SC 在促进缺血性中风神经运动功能恢复中所发挥的作用) 中,结果发现, I. V. 或脑内治疗可显著改善神经运动功能。

附图说明

[0089] 图 1 显示成人骨髓衍生体细胞 (分裂大约 27 次的 ABMSC) 分泌蛋白的双向 SDS-PAGE 分离 (pH3.5 ~ 10, 12% 聚丙烯酰胺凝胶)。凝胶上的各点表示一种分离的特定蛋白,其分子量范围为约 5-200 千道尔顿 (kDa)。X 轴显示根据等电点 (pH3.5-10) 分离的蛋白。Y 轴显示根据分子量 (通过 12% 聚丙烯酰胺凝胶孔道) 分离的蛋白。

[0090] 图 2 显示利用神经生长因子 (NGF) 与人 exABM-SC (约分裂 43 次) 衍生条件培养基使 PC-12 分化为神经元的显微图片。A) RPMI-ITS 培养基。B) RPMI-ITS+NGF。C) RPMI-ITS 以 1 : 50 倍稀释对照培养基 +NGF。D) RPMI-ITS 以 1 : 50 倍稀释与人 ABM-SC 衍生对照培养基 +NGF。箭头表示神经轴突长出。平图版 D 中长出的神经轴突明显较图 B 和 C 中的粗。

[0091] 图 3 显示人体 ABM-SC 对丝裂原诱导的 T 细胞增殖的抑制作用。批号 #RECB801 表示继代培养 19 代的 ABM-SC,批号 #RECB906 表示继代培养约 43 代的 exABM-SC。刺激 T 细胞增殖时,接种的培养物浓度为 2.5-10 微克 / 毫升植物凝集素。72 小时候后收集细胞并用 CD3-PC7 抗体染色。人体间质干细胞被用作阳性对照。(人体间质干细胞购自瑞士 Basel 的 Cambrex Research Bioproducts 公司,现隶属于 Lonza 集团)。

[0092] 图 4 显示外科诱导切入创伤后 7 天猪皮肤的显微图像（显示了两个平面，两个创面均来自实验组 4）。A) 经同种异体猪 ABM-SC（分裂约 28 次）治疗的创面 3 显示伤口完全愈合，并无明显的疤痕。B) 与之相比，仅用载体处理的创面 4 可见明显的疤痕。C) 该图（右图）表示两个治疗组中组织分泌的组织形态学变化，并显示在猪 ABM-SC 治疗创面中组织细胞数量在统计学上显著减少 ($p = 0.03$)（统计学显著性由双尾非配对 T 试验确定），比较了 PBSG 治疗与 pABM-SC 治疗的“组织细胞”伤疤。

[0093] 图 5 表示治疗后 7 天切入创面再次上皮化程度（上图）。用猪 ABM-SC（约分裂 28 次）治疗的创面其表皮比仅用载体处理的厚。左下图显示用猪 ABM-SC 治疗的创面中表皮的组织形态完整，且解剖结构已经完全修复。右下图显示在治疗 7 天时皮下组织中至少瞬时表现出移植特征的猪 ABM-SC（箭头所指）组织形态显微图像。

[0094] 图 6 表示细胞重建后 24 小时 ABM-SC 介导的水解胶原凝胶孔格收缩作用。人体 ABM-SC（约分裂 27 次）在液态生物可降解胶原培养基 (1.8×10^6 细胞 / 毫升) 中得到重建，然后于 $4-8^{\circ}\text{C}$ 保存 24 小时。第二天将液态悬浮细胞置于一个培养盘中形成半固态胶原孔格。该半固态胶原孔格置于一个细胞培养孵育器中，有助于为期 3 天的收缩过程进行。无细胞胶原孔格不发生收缩，证明收缩作用取决于细胞的存在。

[0095] 图 7 表示以不同浓度种植分裂约 43 次的 exABM-SC 时 ABM-SC 介导的水解胶原凝胶孔格的收缩作用。有数据证明，收缩的速率和绝对幅度与细胞数量有关。热灭活细胞未见使凝胶收缩，说明这种活性为生物物理作用。

[0096] 图 8 显示当在用分裂约 43 次的 exABM-SC 形成的水解胶原网孔中培养 3 天时，ABM-SC 介导的几种细胞因子和基质蛋白酶（即 IL-6、VEGF、活化素 -A、MMP-1 和 MMP-2）的分泌作用。

[0097] 图 9 显示在液体（左图）或半固态（右图）生物可降解胶原（利用分裂约 43 次的 exABM-SC 形成）培养基中重建的人体 ABM-SC 显微图像。在这种培养基中重建时，细胞可于 4°C 液体培养基中维持悬浮状态的时间超过 24 小时。当置于培养盘中于 37°C 孵育时，细胞悬浮液会在 1-2 小时内发生固化，产生半固态机构，然后可进行物理处理操作。

[0098] 图 10 显示通过培养在生物可降解胶原培养基培养 3 天的人体 ABM-SC（分裂约 43 次）形成的固态神经组织的显微图像。左上图显示拉伸时该组织的伸缩性。右上图显示固态神经组织的一般质地。下图显示用 Masson's Trichrome 染色的组织其组织分泌作用，说明丰富的胞外基质由 ABM-SC 合成。用同样方法构建的对照凝胶不含细胞，未被这种方法染成蓝色，说明胶原和富含粘多糖的基质由细胞产生。

[0099] 图 11 显示经 TNF- α 刺激及未经刺激的人体 ABM-SC 分泌的大量多种再生性细胞因子前体的一个例子。进行继代培养时，ABM-SC 可分泌几种可达治疗浓度的生长因子和细胞因子，这些因子已公认具有促进血管生成、诱发炎症和创面愈合的作用。研究显示，ABM-SC 可在体外同步分泌几种细胞因子和生长因子，其中包括血管生成因子前体（例如，SDF-1 α 、VEGF、ENA-78 和血管生成素）、免疫调节因子（例如，IL-6 和 IL-8）和伤疤抑制因子 / 创面愈合调节因子（例如，MMP-1、MMP-2、MMP-13 和活化素 -A）。此外，几种此类因子的释放受肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的调节，已知该因子为急性组织损伤过程中释放的炎症性细胞因子。

[0100] 图 12 显示一个模式级联损伤反应（炎症、再生及通过损伤疤痕发生纤维症），以及

在炎症、再生和纤维症发生中发挥作用的例子。

[0101] 图 13 显示用人体 ABM-SC 治疗大鼠后心脏功能得到改善的一个例子。治疗后 4 周, 结果证明, 大鼠接受 ABM-SC 使 $+dp/dt$ (血压改变的最高表达率) 值显著升高。研究过程中心脏功能由第 4 周 $+dp/dt$ 值降为 0 周时值的表达变化 ($\Delta +dp/dt$) 表明, 尽管经载体治疗的大鼠在研究中心心脏功能降低 ($-\Delta$), 但用细胞治疗的动物心脏功能却显著改善 (B)。与载体处理大鼠比较, 接受 ABM-SC 治疗的大鼠的 tau 蛋白水平 (C) 显著降低, 表明左心室顺心性增强。Tau 为反映左心室等容压衰退的不随时间变化的衡量。对于血压改变的最大副表达率 ($-dp/dt$), 研究过程中心脏功能由第 4 周 $-dp/dt$ 值降为 0 周时值的表达变化 ($\Delta -dp/dt$) 表明, 尽管经载体治疗的大鼠在研究中心心脏功能降低 ($-\Delta$), 但用细胞治疗的动物心脏功能却显著改善 (D)。[* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (由 ANOVA 软件得出)]

[0102] 图 14 显示用 hABM-SC 治疗大鼠心肌梗塞模型后纤维化组织减少, 血管生成增强。运用半定量打分法评价接受载体或 ABM-SC 大鼠在诱导心肌梗塞后 7 天时心脏梗塞范围的大小。在输给 ABM-SC 后约 30 天进行组织病理学分析, 结果表明, 与接受载体大鼠相比, 接受 hABM-SC 的大鼠梗塞范围明显缩小。根据现有的数值范围, 接受 hABM-SC 的大鼠组织学得分比载体对照处理大鼠约低两个点。这一数字显示了一个典型的梗塞范围减小的例子。

[0103] 图 15 显示输给 ABM-SC 后大约 30 天时, 对诱导心肌梗塞后 7 天接受载体或 ABM-SC 大鼠心脏结构变化进行组织学测量的结果。

[0104] 图 16 显示同种异体人体 ABM-SC 与 exABM-SC 抑制丝裂原诱导的 T 细胞增殖效应的单向 MLR (混合淋巴细胞反应) 测试结果。

[0105] 图 17 显示同种异体猪 ABM-SC 在双向 MLR 攻击试验中未检测到对 T 细胞介导的免疫应答的抑制作用。对于在基础水平、治疗后 3 天或 30 天收集的样品, 计算其细胞分裂指数, 随后用培养基、载体、pABM-SC 或 ConA 进行体外刺激试验。此后, 对于用 ConA 刺激的 CD3⁺ 细胞, 在治疗第 3 天或第 30 天所有动物的平均分裂指数显著高于来自载体和处理前和剖检后经 pABM-SC 处理的动物的 CD3⁺ 细胞分裂指数 (* $p < 0.05$)。

[0106] 图 18 通过比较基础测定水平 (BL) 与用 hABM-SC 治疗后 90 天获得的测定结果显示三位患者心脏固定灌注缺陷范围的变化。

[0107] 图 19 通过比较基础测定水平 (BL) 与用 hABM-SC 治疗后 90 天获得的测定结果显示三位患者心脏射血分数的变化。

[0108] 图 20 显示由 hABM-SC (即, IL-6, 活化素-A、VEGF、LIF、IGF-II、SDF-1 和 SCF) 在体外分泌的红细胞生成因子分泌量的例子。运用 RAYBIO™ 人细胞因子抗体芯片 (RayBiotech 公司) 测试 ABM-SC 的细胞因子分泌量, 细胞首先在不含血清的加强 DMEM (GIBCO™) 中培养 3 天, 产生条件培养基 (CM)。然后在分析前用 CENTRICON™ PLUS-20 离心式滤器 (Millipore) 浓缩该 CM。

[0109] 图 21 表明 exABM-SC 可在体外以剂量依赖方式降低 TNF- α 表达水平。人 exABM-SC (约分裂 43 次) 以不同接种密度 (例如, 10,000 个细胞/平方厘米, 20,000 个细胞/平方厘米和 40,000 个细胞/平方厘米) 培养时测定其降低 TNF- α 的能力。细胞在不含血清加强 DMEM (GIBCO™) 或附加 10 纳克/毫升 TNF- α 的培养基中培养 3 天。实验中也用热灭活细胞作为阴性对照。Y 轴显示 TNF 的浓度。(Y 轴显示浓缩 100 倍的培养基中物质的浓度)。

[0110] 图 22A 和图 22B 表明, TNF- α 水平的降低似乎由 exABM-SC(分裂大约 43 次)的 sTNF-RI 和 sTNF-RII 分泌作用介导。在不含炎症诱导因子(A)的条件下 sTNF-RI 表现出基础表达水平,而检测到 sTNF-RII 仅在 TNF- α (B) 首次激发时处于优势水平。这些数据表明细胞接种量与检测到的 sTNF-RI 和 sTNF-RII 水平之间呈负相关,提示分泌的受体本身可结合于及覆盖于 TNF- α 上(Y 轴表示浓缩 100 倍培养基中物质浓度)。

[0111] 图 23 表明, IL-1RA 分泌水平(由分裂约 43 次的 exABM-SC 分泌)表现出剂量依赖性。在不含炎症诱导因子条件下 IL-1RA 表现出基础表达水平,但当用 TNF- α 激发时,可溶性物质水平会增高约 10 倍。(Y 轴显示浓缩 100 倍的培养基中物质的浓度)。

[0112] 图 24 显示 exABM-SCIL-1 受体拮抗剂(IL-1RA)与 IL-18 结合蛋白(IL-18BP)的表达水平。人体 exABM-SC 中 IL-1 受体拮抗剂(IL-1RA,见图 36A)和 IL-18 结合蛋白(IL-18BP,见图 36B)即使在不含诸如 TNF- α 等炎症信号的条件下也会处于基础表达水平。

[0113] 图 25A、B 和 C 显示在混合 PBMC 反应测试中,人体 ABM-SC 降低 TNF- α (图 25A)和 IL-13(图 25B)水平,而刺激诱导 IL-2(图 25C)的表达水平升高。(R = 应答者 PBMC, self = 从与应答者相同的供体中分离的经丝裂霉素 C 处理的 PBMC, Stm = 从另一供体中分离的丝裂霉素 C 处理的 PMBC。)

[0114] 图 26 显示人体 ABM-SC 对丝裂原诱导的人外周血单核细胞(PBMC)增殖的抑制作用。批号 #RECB801 表示继代培养约 19 代的 ABM-SC,批号 #RECB906 表示继代培养约 43 代的一批特殊的 ABM-SC。刺激 PBMC 增殖时,培养物接种于 2.5microg/ 毫升植物凝集素中。培养 56 小时后,细胞以脉冲方式接受胸苷(甲基-3H),在 72 小时对同位素参入进行定量测定(CPM)。人间质干细胞可用于阳性对照。

[0115] 详细说明

[0116] 一般情况下,干细胞或其他早期祖细胞会失去可塑性,因为这些细胞已经进入一种特定的分化途径。在生物分子水平,这一过程开始发生时细胞就丧失对特定信号转导分子(例如,有丝分裂原与成形素),该变化可能驱使细胞进行分裂或者变为另一类型细胞。因而,当细胞开始分化时,它就脱离细胞周期(即不能再进行有丝分裂),而进入一种不可逆转的状态(称之为 G0),这样该细胞就不能再进行分裂。进入 G0 状态还与复制老化有关(其特征标志包括胞内蛋白 p21 和 p53 表达增强)。因而,有人认为,失去可塑性(分化为多种类型细胞的能力)是细胞分化或细胞老化的典型前奏。此外,失去可塑性一般也与细胞丧失继续自我更新能力有关。与这种典型的传统公认过程的对照中,本发明的无法预期、令人惊讶的结果是,所使用的 exCF-SC(例如 exABM-SC)即使丧失了可塑性,仍可以进行自我更新(包括一相对恒定的速率进行自我更新)。相应地,本发明的一个实例即为具有连续自我更新能力(例如,继续进行自我更新并产生营养支持因子(或“营养支持细胞”)的能力)的具治疗活性的“晚期细胞”。在另一实例中,本发明的 exCF-SC 和 exABM-SC 不表达大量 p21 和 / 或 p53,“大量”上述分子指可作为细胞老化指标的量(老化可能需要足够高水平 p21、p53 和 / 或其他细胞周调节子)。

[0117] 此外,本发明领域中的大多数专家会期待有一种非造血基质型细胞,这种细胞已丧失可塑性,但仍有部分利用价值或具有产生或促进器官组织再生的能力。因而,本发明的另一个令人惊讶和意想不到的结果即为产生可连续运输的 CF-SC(例如 ABM-SC)的能力,CF-SC 已丧失了可塑性,却仍保留在体外产生新组织并促进体内组织再生的能力。

[0118] 本发明涉及利用自我更新细胞、本文中指集落形成细胞 (CF-SC) (其中一个例子即为成年人骨髓衍生体细胞 (ABM-SC)) 修复、再生和 / 或复活组织的方法。自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC), 如本发明提到的成年人骨髓衍生体细胞 (ABM-SC) 按如下专利所述的方法制备, 如美国专利公开号 20030059414 (美国专利申请号 09/260, 244, 2001 年 9 月 21 日归档) 和美国专利公开号 20040058412 (美国专利申请号 10/251, 685, 2002 年 9 月 20 日归档)。上述引用的各个专利申请文件在此一并归入本申请书的参考文献中。同时并入本文参考文献的还有《美国临时专利申请》第 60/929, 151 号与第 60/929, 152 号文件 (各文件于 2007 年 6 月 15 日归档), 《美国临时专利申请》第 60/955, 204 号文件 (于 2007 年 8 月 10 日归档) 和《美国临时专利申请》第 60/996, 093 号文件 (于 2007 年 11 月 1 日归档)。

[0119] 特别是, 从细胞群落源 (例如, 骨髓 (ABM-SC 和 exABM-SC)、脂肪、皮肤、胎盘、肌肉、脐带血或者结缔组织) 分离的 CF-SC 在合适培养基 (例如但不局限于附加 4mM 谷氨酸和 10% 牛胎血清的基本必需培养基 α (例如 HYCLONE™) 中可粘附于细胞表面, 在低氧条件 (例如但不局限于氧气浓度约为 2-5%, 二氧化碳浓度约为 5%, 与氮气平衡) 下培养, 随后以低密度 (例如 30-1000 个细胞 / 平方厘米) / 运输, 因此, CF-SC 经历数次群落分裂 (例如, 但不局限于经历 10、15、20、25、30、35、40、45 和 / 或 50 次群落分裂) 后仍保持必需的恒定群落分裂速率 (例如, 但不局限于不到约 30 小时的分裂速率)。

[0120] 本发明的实例可用在低氧条件下培养的 CF-SC 和 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 产生, 这里所说的氧气浓度范围为 1-20% (例如, 氧气浓度约为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15% 或 20%) 加二氧化碳并用氮气平衡。例如, ABM-SC 可在低氧条件下培养, 这里所说的氧气浓度约为 20%、不到约 20%、约 15%、不到约 15%、约 10%、不到约 10%、约 7%、不到约 7%、约 6%、不到约 6%、约 5%、不到约 5%、约 4%、不到约 4%、约 3%、不到约 3%、约 2%、不到约 2%、约 1%, 或者, 此处所述的低氧条件其氧气浓度范围从约 1% 到约 20%、从约 1% 到约 15%、从约 1% 到约 10%、从约 1% 到约 5%、从约 5% 到约 20%、从约 5% 到约 15%、从约 5% 到约 10%、从约 10% 到约 15%、从约 10% 到约 20%、从约 2% 到约 8%、从约 2% 到约 7%、从约 2% 到约 6%、从约 2% 到约 5%、从约 2% 到约 4%、从约 2% 到约 3%、从约 3% 到约 8%、从约 3% 到约 7%、从约 3% 到约 6%、从约 3% 到约 5%、从约 3% 到约 4%、从约 4% 到约 8%、从约 4% 到约 7%、从约 4% 到约 6%、从约 4% 到约 5%、从约 5% 到约 8%、从约 5% 到约 7%、从约 5% 到约 6%、或者约 5%。

[0121] 本发明的实例可用在低氧条件下培养的 CF-SC 和 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 产生, 这里所说的二氧化碳浓度范围为约 1-15% (例如, 二氧化碳浓度约为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、或 15%) 加低氧, 并用氮气平衡。本发明的实例可用通过接种低密度细胞被运输的 CF-SC 和 exCF-SC (例如, ABM-SC 和 exABM-SC) 产生, 此处所说的细胞密度范围为 1-2500 个细胞 / 平方厘米 (例如, 细胞密度为 1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、或 2500 个细胞 / 平方厘米)。例如, ABM-SC 可在接种过密度不到约 2500 个细胞 / 平方厘米、不到约 1000 个细胞 / 平方厘米、不到约 500 个细胞 / 平方厘米、不到约 100 个细胞 / 平方厘米、不到约 50 个细胞 / 平方厘米、不到约 30 个细胞 / 平方厘米、或不到 10 个细胞 / 平方厘米的被运输。本发明的实例可能用 CF-SC 和 exCF-SC (例如, ABM-SC

和 exABM-SC) 产生,其细胞群落分裂速率维持在一个不到约 24-96 小时(例如,细胞群落分裂速率维持在不到约 24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90 或 96 小时)的范围内。本发明的实例可用 CF-SC 和 exCF-SC(例如,ABM-SC 和 exABM-SC)产生,该细胞群落经过一个 5-50 群落分裂次数范围(例如,该群落分裂速率维持在约 5-10、5-15、5-15、5-20、5-30、5-35、5-40、5-45 或 5-50 仍维持一个必需的恒定的分裂速率)仍维持一个必需恒定的分裂速率。

[0122] 本发明的实例包括与药物可接受成分连接的 CF-SC 和 exCF-SC(例如,ABM-SC 和 exABM-SC)的应用,该药物可接受成分可能为液态、半固态或固态物质。这里使用的术语“液态、半固态或固态”专指包含细胞的药物可接受成分可表现出较宽的物理状态范围,即从 1) 常见液态(例如通常用的生理盐水);到 2) 粘度由低到高的粘稠状态,包括胶体样、明胶样或粘弹状态(药物可接受成分包含由极高到极低水平的胞外水分,例如,因此该成分处于从可缓慢渗出油状物或蜜状物的状态到明胶样或粘弹性日益增强的状态,此状态可能为果冻样,具有易伸缩、半弹性和/或韧性);到 3) 固态(具有极低的胞外水分水平),基质内的活细胞已经重塑了环境,在此环境中细胞最初悬浮进入一种耐久的、非明胶化的、但仍可弯曲的、具半弹性的及柔韧的基质中(例如,同样哺乳动物皮肤的部分易弯曲性和半弹性。参见图 10A 和 10B。

[0123] (注:粘弹性,亦称作内摩擦力,用于描述进行可塑性变形时既具粘性又具弹性特征的物质。粘性物质,如蜂蜜,抗拒纯粹的流动,当受到张力时会随着时间出现线性收缩。弹性物质在被拉开时会立即收缩,张力一旦去除就会迅速返回原来的位置。粘弹性物质同时具有这两种性质,因而表现出时间依赖性收缩。)

[0124] 临床输给液态、半固态和固态载体中的细胞将实现治疗应用,形成创面床的轮廓,而在创面中不出现不必要的渗出物。

[0125] 组合型可溶性基质组分如含 CF-SC 和 exCF-SC(例如,ABM-SC 和 exABM-SC)的胶原或纤维素诱导细胞群落正调节重要分泌蛋白如细胞因子与基质金属蛋白酶等的表达。而且,ABM-SC 应用于外科手术诱导的创面可能具有存进创面闭合、防止结疤的特点,因此治疗后疤痕最小(参见实例 7)。

[0126] 此外,CF-SC 和 exCF-SC(例如,ABM-SC 和 exABM-SC)明显的免疫调节特性(参见实例 4)使得融入这些细胞的组分和治疗用于治疗涉及皮肤的免疫功能紊乱症和相关疾病格外诱人,皮肤免疫功能紊乱症和相关疾病例如但不局限于慢性炎症性皮肤病、牛皮癣、扁平苔癣、红斑狼疮(LE)、移植体-宿主病(GVHD)和药疹(即不良皮下药物反应)。

[0127] 来自 CF-SC 和 exCF-SC(例如,ABM-SC 和 exABM-SC)条件培养基的分泌蛋白和细胞上清液组分可在不含血清条件下生产,浓缩并以使其适于体内应用的方式制成制剂。当以这种方式制备时,有研究已经证实,来自 ABM-SC 的不含血清条件培养基中含有大量以治疗有效浓度存在的再生性细胞因子、生长因子和基质蛋白酶的前体(参见表 1A、1B 和 1C)。ABM-SC 产生的几百种可溶性因子的复杂混合物可用 2D SDS PAGE 加以分离(参见图 1)。个别蛋白和其他大分子可从这些凝胶中切离,并用这一领域常规技术进行鉴定,例如 MALDI-TOF 质谱(基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱分析)。

[0128] 利用这些公开的技术方法(还有其他分离技术如色谱分析或者空纤维细胞培养系统),理想的蛋白或细胞上清液组分可通过分离、透析、冻干等过程获得,并以固态形式保

存,或在合适的载体中得到重建,再用于治疗给药。在一个实例中,代办或细胞上清组分可在半固态胶原或纤维素载体中进行重建,并局部涂用于创面床。

[0129] 除了由 CF-SC 和 exCF-SC (例如,ABM-SC 和 exABM-SC) 产生的产品之外,任意量及任意类型的药物可接受小分子到大分子化合物 (包括生物制剂如脂类、蛋白质和核酸) 可用一种药物可接受载体如克生物降解基质将其全部结合到一起制成制剂,用于给药,这些基质中含有 CF-SC 和 exCF-SC (例如,ABM-SC 和 exABM-SC) 及其产生的产物。作为一种很小的样品,此种附加分子可能包括小分子药物如消炎药、抗体、维生素以及矿物质 (例如钙),这些都是常见的药物,但只属于几类药物。与此类似,极其少量的生物制剂样品可能包括胞外基质蛋白、血浆凝集蛋白、抗体、生长因子、趋化因子、细胞因子、脂类物质 (例如心磷脂和神经鞘磷脂) 和核酸 (核酶、反义寡聚核苷酸或者 cDNA 表达结构),包括这类分子的变构体及衍生物如各种异构体、分子片段、亚单位以及取代物、插入物和缺失突变体。这些仅是通过举例提及,由于该领域的技术人员会喜欢这种方式,结合本文提供的教学材料,任意数量的具有结构或治疗优点的额外化合物均可被包含在内,与药物可接受载体如生物可降解基质一同给药,这些基质中含有 CF-SC 和 exCF-SC (例如,ABM-SC 和 exABM-SC) 及其产生的产物。

[0130] 本发明的一个实例包括一种刺激一位糖尿病患者伤口闭合的方法,如糖尿病脚、静脉性腿部溃疡或者术后创面等。通过用 CF-SC 和 exCF-SC (例如,ABM-SC 和 exABM-SC) 的药物组分或这些细胞产生的产物治疗、并与自然形成的胞外基质和 / 或血浆蛋白组分如天然纯化物或重组人、牛、猪胶原蛋白、纤维蛋白原和 / 或凝血酶联用,可促进创面闭合的刺激作用。药物组分可被用于包括人在内的哺乳动物的组织损伤部位。在另一实例中,进行局部给药的生物可降解基质由混合物组分如天然纯化物或者重组胶原蛋白、纤维蛋白原和 / 或凝血酶形成,同时与同种异体 CF-SC 和 exCF-SC (例如,ABM-SC 和 exABM-SC) 联用。

[0131] 在本发明的另一实例中,一种同种异体细胞和基质组成的药物复合物在体外培养了一段时间 (例如,但不限于 1 天到 1 个月或这更长),产生了全新的结缔组织。

[0132] 在本发明的另一实例中,生物可降解基质为牛胶原蛋白或者聚乙二醇酸。在另一实例中,该药物复合物在不含血清的培养基中在低氧条件下培养进行培养,此处低氧条件指的是氧气浓度约为 4-5%、二氧化碳浓度 5%,并用氮气平衡。

[0133] 在一个实例中,本发明包含一种制备药物复合物的方法,其中包括以下步骤:

[0134] 配制由可溶性胶原蛋白、附加谷氨酸的不含血清培养基、碳酸二氢钠和 HEPES (有的包括胰岛素、转铁蛋白和 / 或硒) 组成的溶液;

[0135] 用上述溶液重悬 CF-SC 或 exCF-SC (例如,ABM-SC 或 exABM-SC);

[0136] 并将细胞悬液转移至一个组织模子中或其等同物,例如当将其置于细胞培养箱中时,该悬浮液就会在 37°C 凝固。

[0137] 上述制备药物复合物的方法可能还包括一个操作步骤,即将培养物在低氧条件 (即氧气浓度 4-5%、二氧化碳浓度 5%,并用氮气平衡) 孵育一段时间 (例如,但不局限于 1-3 天或更长时间)。

[0138] 在一个实例中,本发明包含一种制备药物复合物的方法,其中包括以下步骤:

[0139] 配制由纤维蛋白原和凝血酶组成的溶液;

[0140] 用上述溶液重悬 CF-SC 或 exCF-SC (例如,ABM-SC 或 exABM-SC),将该重悬液用于

一个开放的创面。

[0141] 在一个实例中,本发明包含一种制备药物复合物的方法,其中包括以下步骤:

[0142] 配制由可溶性胶原蛋白、附加谷氨酸的不含血清培养基、碳酸二氢钠和 HEPES(有的包括胰岛素、转铁蛋白和 / 或硒)组成的溶液;和

[0143] 将少量或部分来自 CF-SC 或 exCF-SC(例如, ABM-SC 或 exABM-SC)的细胞上清复合物与上述溶液混合,

[0144] 并将细胞悬液转移至一个组织模子中或其等同物,例如当将其置于细胞培养箱中时,该悬浮液就会在 37℃凝固。

[0145] 上述制备药物复合物的方法可能还包括一个操作步骤,即将组织模子或其等同物在大气氧压条件(即氧气浓度 18-21%,二氧化碳浓度 5%)孵育。

[0146] 在一个实例中,本发明包含一种制备药物复合物的方法,其中包括以下步骤:

[0147] 配制由纤维蛋白原和凝血酶组成的溶液;

[0148] 将少量或部分来自 CF-SC 或 exCF-SC(例如, ABM-SC 或 exABM-SC)的细胞上清复合物与上述溶液混合;和

[0149] 将该重悬液用于一个开放的创面。

[0150] 在另一实例中,本发明包含由下功能障碍症或疾病引起的组织损伤治疗中的组织再生过程:免疫功能紊乱(例如自身性免疫病)、炎症(包括急慢性炎症性免疫功能紊乱)、缺血(例如心肌梗塞)、机械损伤(例如烫伤、撕裂及擦伤)、感染病(例如细菌、病毒及真菌感染)和慢性皮肤创面。本发明包括对多种组织损伤及功能紊乱症之来由,例如但不限于中枢神经系统(大脑)与外周神经系统(如脊髓)神经损伤与功能紊乱(例如由神经创伤及神经退化性疾病引起的疾病等)。本发明的另一实例包括对某些疾病与功能紊乱症的治疗,这些治疗需要骨、结缔组织和软骨再生,疾病和功能紊乱症包括急慢性炎症性肝脏病、血管功能不足和角膜及黄斑退化症。本发明的另一实例包括治疗心血管与肺损伤及功能紊乱(例如,心肌缺血和血管的修复与再生)。本发明的另一实例包括治疗胰腺与肝组织,以及其他内分泌与外分泌腺体的损伤及功能紊乱症。本发明的另一实例包括治疗胸腺以及其他免疫细胞产生与定居器官的损伤及功能紊乱症。本发明的另一实例包括治疗生殖泌尿系统(例如输尿管和膀胱)的损伤和功能紊乱。本发明的另一实例包括治疗疝气及疝气化组织。本发明的另一实例包括心脏瓣膜的修复、再生和重建。CF-SC 和 exCF-SC(例如, ABM-SC 和 exABM-SC)或者衍生自 CF-SC 和 exCF-SC(例如, ABM-SC 和 exABM-SC)亦可在固态胶原蛋白基质中得到重建,当细胞以这种方式得到重建时,固态基质可在几天内重新形成,产生使其自身特有基质发生纤维化的新型组织。这种由新组织衍生而来的 CF-SC 和 exCF-SC(例如, ABM-SC 和 exABM-SC)易弯曲、可缝合、并具有生物活性(参见图 6、7 和 10A-C)。这些结构也可进行灭菌、化学交联、冻干或进一步加工,使细胞失活,无法继续生长。

[0151] 此类结构在治疗包括全厚度烫伤面在内的烫伤方面具有独特的优势。重建血管化创面床时,在死组织外科复苏治疗之后,重度烫伤患者常用人工皮肤置换物进行治疗。创面床愈合之后,这些患者随后用人工皮肤产品或通过涂用上皮细胞治疗,以便再长出宿主上皮组织。

[0152] 正如本文所述,用于替代传统人工皮肤产品(例如 DERMAGRAFT™)时,通过抑制或

减弱不需要的 T 细胞介导的免疫反应（参见实例 5），复合物可延长随后移植的同种异体皮肤的寿命。通过调节 T 细胞介导的免疫应答反应，本发明的复合物可使人工皮肤得到后续再应用，而且具备足够的时间刺激患者自身皮肤的在生长。

[0153] 研究显示，上述引用的 ABM-SC 具有下列特性：

[0154] 体外

[0155] • 分泌在血管生成和组织修复中发挥重要作用的细胞因子。

[0156] • 释放预防和抑制疤痕形成和基质翻覆。

[0157] • 促进具有潜在血管生成活性的内皮细胞标记分子的迁移。

[0158] 体内

[0159] • 显著改善对急性心肌梗塞（AMI）多动物模型的疗效。

[0160] • 心脏内或脑内细胞转运的有效性和强耐受性。

[0161] • 注射后数周组织中检测不到移植细胞。

[0162] • 几乎不发生针对细胞的免疫应答。

[0163] 在本发明的一个实例中，由 CF-SC 和 exCF-SC（例如，ABM-SC 和 exABM-SC）分泌的大量再生性细胞因子前体可能用于受损组织与器官（例中，由心肌梗塞（AMI）或中风引起的心衰竭性心脏与神经器官组织损伤）的治疗、修复、再生和 / 或复苏。这些因子包括图 11 中所示的 CF-SC 和 ABM-SC（例如，ABM-SC 和 exABM-SC）分泌的细胞因子。例如，包括但不限于 SDF-1 α 、VEGF、ENA-78、BDNF、IL-6、IL-8、ALCAM、MMP-2、活化素、MMP-1、MMP-13、MCP-1。请参见图 11。其他诸如表 1A、1B 和 1C 中所列出的因子亦可能有 CF-SC 和 exCF-SC（例如，ABM-SC 和 exABM-SC）分泌。参见表 1A、1B 和 1C。

[0164] 由 CF-SC 和 exCF-SC（例如，ABM-SC 和 exABM-SC）分泌的再生性细胞因子分泌可能受到刺激因子（例如，肿瘤坏死因子（TNF- α ））预治疗的增强或者诱导，其目的在于诱导条件细胞培养基的产生或向患者输给细胞之前激发该细胞。急性缺血、创伤或炎症可导致受影响的器官组织出现星状细胞，并发生化学反应。参见图 12。在炎症期发生多种因子的释放和细胞向受伤部位的聚集。在再生期发生循环细胞的募集，以便进行功能组织的适当修复。还有，在纤维化期，发生了纤维伤疤的沉积，这可能是器官功能的一部分。而且，各种细胞因子与其他生物分子在这些过程的不同时期发挥着不同的作用。参见图 12。

[0165] 本发明中 CF-SC 和 exCF-SC（例如 ABM-SC 和 exABM-SC）的应用包括治疗和预防炎症的方法、刺激器官与组织再生减少纤维（既指组织结疤）发生的方法、和通过接受刺激或未接受刺激的 CF-SC 和 exCF-SC（例如 ABM-SC 和 exABM-SC）产生的复合物（例如，细胞因子、蛋白酶、胞外基质蛋白、等等）刺激产生血管生成作用的方法。

[0166] 在另一实例中，CF-SC 和 exCF-SC 可能抑制纤维化这一生物过程。组织纤维化是许多人组织创伤愈合、结疤及发生炎症的天然副产物。组织纤维化，亦被称作纤维化结疤，是再生具有最佳功能组织、尤其是心脏和中枢神经系统（CNS）组织的重要障碍，因为疤痕组织取代了最佳器官功能需要的细胞。本文公开的细胞治疗技术有助于防止或减少组织纤维化发生，因而促进受损组织的愈合。通过两种或更多种分泌蛋白或细胞产生的包括膜结合细胞表面分子在内的复合物之间的累加效应或协同效应可防止组织纤维化发生。此外，由输给的 CF-SC 和 exCF-SC（例如 ABM-SC 和 exABM-SC）诱导或产生的基质蛋白酶在防止纤维化发生中起着很重要的作用。

[0167] 在本发明的另一应用实例中,血管生成(亦称之为心血管化)在理想组织中有所增加。血管生成或者说是新血管形成是再生机制的关键步骤,因为新形成组织必须有血液供应,当内皮细胞在退化过程、疾病发展进程或急性损伤过程中丢失,血管生成作用就变得至关重要,对于这些相关疾病本发明就是很好的治疗方法。因此,CF-SC 和 exCF-SC(例如 ABM-SC 和 exABM-SC) 或由其产生的复合物的使用有利于刺激靶组织器官(例如,尤其是在受损的心脏组织中)中产生血管生成作用。血管生成是组织修复过程的重要步骤,可连同纤维化抑制作用一起优化受损组织的愈合。

[0168] 本发明的另一应用实例涉及无细胞移植条件下组织再生或者复苏过程的刺激诱导。体内研究已经显示,人体 ABM-SC 或 exABM-SC 的长期移植或者组织特异性分化一般观察不到,提示这些细胞诱导组织再生的机制不是通过细胞取代、而是通过宿主对细胞本身的应答反应和/或由其产生的因子来实现的。但是,如果假设 ABM-SC 在骨髓中的作用为提供结构与营养支持,这就显得不足为奇了。因此,本发明包括受损组织与器官的治疗,输给的 CF-SC 和 exCF-SC(例如 ABM-SC 和 exABM-SC) 不发生永久的或长期的组织或器官移植。相反,治疗性 CF-SC 和 exCF-SC(例如 ABM-SC 和 exABM-SC) 提供营养支持因子,抑制细胞死亡,抑制炎症反应(例如,免疫细胞性炎症反应),促进胞外基质重新形成,和/或刺激血管生成,生成的血管在显著或可检测水平不变成已修复组织的组成部分。

[0169] 本发明的另一实例发现,经过一段时间后,在实验动物的任何部位都检测不到输给的细胞,这一结果提示输给的细胞全部从机体清除。这种现象提示细胞分泌的因子在受损组织修复中发挥必要的作用。

[0170] 在本发明的另一个解释其应用价值的实例中,本文中公开的 hABM-SC 来源于一个供体。这样,这些细胞在患者体内属于同种异体移植细胞,可能提示这些移植细胞可能会刺激诱导不良免疫应答反应。然而,令人惊奇的是,我们发现,本文公开的同种异体移植细胞实质性上可抑制丝裂原诱导的体内 T 细胞增殖过程,这样就避免其诱导体内 T 细胞依赖性免疫应答。T 细胞介导免疫应答是免疫过程的关键因素,可破坏受损组织创伤愈合、再生及复苏过程。

[0171] 本文使用的“有效量”指的是足以产生可检测的组织、器官或生物系统(例如免疫系统)效能、功能、完整性、结构或组成发生改善的量,这里所说的“改善”意为受损组织、器官或生物系统全部或部分功能改善与恢复、结构修复与再生或者创面愈合的指示特征。

[0172] 表 1A、1B 和 1C 列出了在无血清细胞培养基中继代培养的人体 ABM-SC 分泌的更多细胞因子、生长因子、可溶性受体和基质蛋白酶。培养基上清浓缩液 #1 = 附加 4mM L-谷氨酰胺的加强 DMEM(Gibco™) 培养基。培养基上清浓缩液 #2 = 附加胰岛素-转铁蛋白-硒(Gibco™) 的含 4mM L-谷氨酰胺和 HEPES 液(HyClone) 的 RPMI-1640 培养基。

[0173] 结果证明,对组织再生和免疫系统调节及其重要的大量营养因子和可溶性受体由 ABM-SC 在这些条件下培养时产生,且处在治疗相关水平。显然,早期实验表明,基本培养基中补加胰岛素、转铁蛋白和硒是获得如表 1A、1B 和 1C 所示的分泌蛋白水平所必需的。

[0174] 免疫功能紊乱

[0175] 本发明的细胞和复合物可被主要用于预防、治疗和/或改善免疫、自身免疫及炎症性疾病和功能紊乱症。这些功能紊乱症的某些例子如下所述,这些列出的病症仅作为范例,其意图不在对所有免疫、自身免疫及炎症性疾病与功能紊乱症的综合理解,也不应将其

解释为相关病理机制的局限性,用本发明的细胞及复合物可治疗这些病症。

[0176] 具有全部或部分自身免疫性病因学的某些疾病:急性弥散性脑脊髓炎(ADEM)、爱迪生氏病、关节强硬性脊椎炎、抗磷脂抗体综合症(APS)、非可塑性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎、脂泻病、克罗恩病、1型糖尿病、妊娠期天疱疮样病、古德帕斯彻氏综合征、甲状腺机能亢进、传染性神经元炎(GBS)、桥本氏病、特发性血小板减少性紫癜、川崎氏病、红斑狼疮、多发性硬化症、重症肌无力、斜视眼肌阵挛(OMS)、视神经炎、奥德氏甲状腺炎、天疱疮、恶性贫血、多发性关节炎、原发性胆汁性肝硬化、类风湿性关节炎、莱特尔氏综合征、干燥综合征、高安氏动脉炎、颞动脉炎(也称作巨细胞动脉炎)、温抗体型自身免疫性溶血性贫血、和韦格纳氏肉芽肿。

[0177] 某些可能与自身免疫有关联的疾病全身脱毛、白塞病、南美洲锥虫病、慢性疲劳综合征、家族性自主神经异常、子宫内膜异位、化脓性汗腺炎、间质性膀胱炎、莱姆病、硬斑病、神经性肌强直、嗜眠发作、牛皮癣、肉状瘤病、硬皮病、溃疡性结肠炎、白癜风、和外阴痛。

[0178] 某些超敏反应病及功能紊乱症:变应性哮喘、变应性结膜炎、过敏性鼻炎(“甘草热”)、过敏性反应、重症肌无力、血管性水肿、血管炎型变态反应、异位性皮炎(湿疹)、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性恶性贫血、乳糜泄、接触性皮炎(例如,毒葛性皮炎、嗜曙红细胞过多、胎儿成红细胞增多、霉尘肺(阿都司氏型反应))、古德帕斯彻氏综合征、甲状腺机能亢进、淋巴瘤性(样)甲状腺肿、新生儿溶血症、免疫复合物型肾小球肾炎、免疫性血小板减少症、重症肌无力、天疱疮、类风湿性发热、类风湿性关节炎、血清病、亚急性细菌性心内膜炎、麻风、疟疾、结核病、全身性红斑狼疮、颞动脉炎、输血反应、移植排斥、和荨麻疹。

[0179] 某些炎症性功能紊乱症:变态反应、关节强硬性脊椎炎、关节炎、哮喘、自闭性小肠结肠炎、自身免疫病、白塞病、慢性炎症、肾小球肾炎、炎症性肠病(IBD)、盆腔炎性疾病、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、再灌注损伤、类风湿性关节炎、移植排斥、和脉管炎。

[0180] 某些免疫缺陷性性功能紊乱症:B细胞缺陷症(如X连锁无丙种球蛋白血症和选择性免疫缺陷症)、T细胞缺陷症(如DiGeorge氏综合征(先天性胸腺萎缩)、慢性皮肤粘膜念珠菌病、高免疫球蛋白IgM血症和白介素12受体缺乏症)、复合性T细胞与B细胞功能异常症(如重型复合性免疫缺陷病(SCID)、维斯科特-奥尔德里奇综合征和共济失调毛细血管扩张)、补体缺陷症(如遗传性血管性水肿或遗传性血管神经性水肿和阵发性睡眠性血红蛋白尿)、吞噬细胞缺陷症(例如白细胞粘附性缺陷症、慢性肉芽肿病(CGD)、契-东综合征、工作综合征(高IgE血症)、周期性低中性粒细胞血症、髓过氧化物酶缺乏症、6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏症和 γ 干扰素缺乏症)、和常见变异型免疫缺陷病(CVID)、先天性常染色体隐性遗传时失常、和获得性免疫缺陷性综合征(AIDS)。

[0181] 本发明实例

[0182] 本发明的个别实例包括如下:

[0183] A1. 达到受试者治疗有效量的生物复合物或复合物给药方法,其中包括输给该受试者自我更新型集落形成细胞的一个单独细胞群落,此处所述细胞群落中的细胞具有实质性非多能性分化能力,所述细胞具有正常染色体组型,且所述细胞为退化型细胞。

[0184] A2. 达到受试者治疗有效量的生物复合物或复合物给药方法,其中包括:

[0185] (i) 分离由自我更新型集落形成细胞的一个单独群落产生的生物复合物或复合物;和

- [0186] (ii) 给所述受试者用所述生物复合物或复合物进行治疗，
- [0187] 所述细胞群落中的细胞具有实质性非多能性分化能力，所述细胞具有正常染色体组型，且所述细胞为退化型细胞。
- [0188] A3. 受试者受损组织修复、治疗或促进再生的方法，其中包括输给该受试者符合治疗有效量的自我更新型集落形成细胞的单个细胞群落，此处所述细胞群落中的细胞具有实质性非多能性分化能力，所述细胞具有正常染色体组型，且所述细胞为退化型细胞。
- [0189] A4. 受试者受损组织修复、治疗或促进再生的方法，其中包括：
- [0190] (i) 分离由自我更新型集落形成细胞的一个单独群落产生的生物复合物或复合物；和
- [0191] (ii) 用所述生物复合物或复合物对所述受试者进行治疗，
- [0192] 所述细胞群落中的细胞具有实质性非多能性分化能力，所述细胞具有正常染色体组型，且所述细胞为退化型细胞。
- [0193] A5. 降低受试者炎症活性、免疫活性或自身免疫活性的方法，其中包括输给该受试者符合治疗有效量的自我更新型集落形成细胞的单个细胞群落，此处所述细胞群落中的细胞具有实质性非多能性分化能力，所述细胞具有正常染色体组型，且所述细胞为退化型细胞。
- [0194] A6. 处理或降低受试者炎症活性、免疫活性或自身免疫活性的方法，其中包括：
- [0195] (i) 分离由自我更新型集落形成细胞的一个单独群落产生的生物复合物或复合物；和
- [0196] (ii) 给所述受试者用所述生物复合物或复合物进行治疗，
- [0197] 所述细胞群落中的细胞具有实质性非多能性分化能力，所述细胞具有正常染色体组型，且所述细胞为退化型细胞。
- [0198] A7. 实例 A1-A6 中任意一种方法，给药之前，所述细胞群落在体内已经历了大量细胞分裂，足以使其能够导致所述细胞群落中的细胞丧失多能性分化能力。
- [0199] A8. 实例 A1-A7 中任意一种方法，所述细胞具有单能性分化能力。
- [0200] A9. 实例 A1-A8 中任意一种方法，所述细胞具有实质性自我更新能力。
- [0201] A10. 实例 A1-A9 中任意一种方法，给药之前，所述细胞群落在体内已经历了大量细胞分裂，但仍保留实质性自我更新能力。
- [0202] A11. 实例 A1-A10 中任意一种方法，所述单个细胞群落中的细胞不属于胚胎干细胞。
- [0203] A12. 实例 A1-A11 中任意一种方法，所述单个细胞群落中的细胞不属于胚胎干细胞、间质干细胞、造血干细胞、多能性成人祖细胞 (MAPC)、多能性成人干细胞或成纤维细胞。
- [0204] A13. 实例 A1-A12 中任意一种方法，所述细胞不分化为一种或多种细胞类型，这些细胞类型选自下列各组：
- [0205] a) 骨细胞；b) 脂肪细胞；和 c) 软骨细胞。
- [0206] A14. 实例 A1-A13 中任意一种方法，在骨诱导条件下所述细胞在治疗后积累的钙达不到检测水平。
- [0207] A15. 实例 A1-A14 中任意一种方法，所述骨诱导条件包括暴露在外源性 Noggin 下。
- [0208] A16. 实例 A1-A15 中任意一种方法，所述单个细胞群落中的细胞衍生自结缔组织。

- [0209] A17. 实例 A1-A16 中任意一种方法,所述单个细胞群落中的细胞不属于基质细胞。
- [0210] A18. 实例 A1-A17 中任意一种方法,所述单个细胞群落中的细胞共表达 CD49 和 CD90。
- [0211] A19. 实例 A1-A18 中任意一种方法,经过体内多次细胞分裂后该细胞群落仍维持基本恒定的分裂速率。
- [0212] A20. 实例 A1-A19 中任意一种方法,所述细胞表达的一种或多种抗体达不到检测水平,这些抗体选自下列各组:
- [0213] a) CD10 ;b) STRO-1 ;和 c) CD106/VCAM-1。
- [0214] A21. 实例 A1-A20 中任意一种方法,所述细胞表达的一种或多种抗体表达检测呈阳性,这些抗体选自下列各组:
- [0215] a) CD44 ;b) HLA-I 类抗原 ;和 c) β 2 微球蛋白。
- [0216] A22. 实例 A1-A21 中任意一种方法,所述细胞表达或分泌复合物的量达到检测水平,这些复合物选自下列各组:
- [0217] a) TNF-R1 ;b) 可溶性 TNF-R1 ;c) TNF-RII ;d) 可溶性 TNF-RII ;e) IL-1R 拮抗剂 ;
- [0218] 和 f) IL-18 结合蛋白。
- [0219] A23. 实例 A1-A21 中任意一种方法,所述细胞表达或分泌复合物的量达到检测水平,这些复合物来自包含表 1A、1B 和 1C 中所示的复合物。
- [0220] A24. 实例 A1-A23 中任意一种方法,所述单个细胞群落中的细胞最初分离自包含下列组织的组织源:
- [0221] a) 骨髓 ;b) 脂肪组织 / 脂肪 ;c) 皮肤 ;d) 胎盘 ;e) 脐带 ;f) 肌腱 ;g) 韧带 ;h) 肌肉筋膜 ;和 i) 其他结缔组织。
- [0222] A25. 实例 24 中的方法,所述组织源为人。
- [0223] A26. 实例 A1-A25 中任意一种方法,所述细胞群落经过大量体内细胞分裂后仍保持基本恒定的分裂速率,细胞分裂次数选自下列各组:
- [0224] a) 1-5 次细胞分裂 ;b) 5-10 次细胞分裂 ;c) 10-20 次细胞分裂 ;d) 20-30 次细胞分裂 ;e) 30-40 次细胞分裂 ;f) 40-50 次细胞分裂 ;g) 1-50 次细胞分裂 ;h) 5-50 次细胞分裂 ;i) 10-50 次细胞分裂 ;j) 20-50 次细胞分裂 ;k) 30-50 次细胞分裂 ;l) 1-10 次细胞分裂 ;m) 1-20 次细胞分裂 ;n) 1-30 次细胞分裂 ;o) 1-40 次细胞分裂 ;p) 5-20 次细胞分裂 ;q) 5-30 次细胞分裂 ;r) 5-40 次细胞分裂 ;s) 10-30 次细胞分裂 ;t) 10-40 次细胞分裂 ;和 u) 20-40 次细胞分裂。
- [0225] A27. 实例 A1-A26 中任意一种方法,所述细胞进行了若干次群落分裂,这些分裂次数选自下列各组:
- [0226] a) 至少约 10 次群落倍增 ;b) 至少约 15 次群落倍增 ;c) 至少约 20 次群落倍增 ;d) 至少约 25 次群落倍增 ;e) 至少约 30 次群落倍增 ;f) 至少约 35 次群落倍增 ;g) 至少约 40 次群落倍增 ;h) 至少约 45 次群落倍增 ;和 i) 至少约 50 次群落倍增。
- [0227] A28. 实例 A1-A27 中任意一种方法,所述生物复合物或复合物结合于所述细胞群落中或其细胞表面。
- [0228] A29. 实例 A1-A28 中任意一种方法,所述生物复合物或复合物分泌后进入所述细胞群落的胞外环境中。

[0229] A30. 实例 A1-A29 中任意一种方法,所述生物复合物或复合物为一种或多种分子,这些分子选自下列各组物质:

[0230] a) 蛋白质;b) 碳水化合物;c) 脂类;d) 脂肪酸;e) 脂肪酸衍生物;d) 气体;和 e) 核酸。

[0231] A31. 实例 30 中的方法,所述蛋白质选自下列各组物质:

[0232] a) 糖蛋白;b) 细胞因子;c) 趋化因子;d) 淋巴因子;e) 生长因子;f) 营养因子;g) 成形蛋白;和 h) 激素。

[0233] A32. 实例 A31 中的方法,所述生物复合物或复合物与某些分子结合,使其失去生物活性或降低其生物活性,这些分子选自下列各组物质:

[0234] a) 脂肪酸;b) 脂肪酸衍生物;c) 受体分子;d) 细胞因子;e) 趋化因子;f) 淋巴因子;g) 生长因子;h) 营养因子;i) 成形蛋白;和 j) 激素。

[0235] A33. 实例 32 中的方法,所述生物复合物或复合物为结合同源配体的受体,这些配体选自下列各组物质:

[0236] a) 脂肪酸;b) 脂肪酸衍生物;c) 受体分子;d) 细胞因子;e) 趋化因子;f) 淋巴因子;g) 生长因子;h) 营养因子;i) 成形蛋白;和 j) 激素。

[0237] A34. 实例 A1-A33 中任意一种方法,所述细胞被诱导后,一种或多种生物复合物的表达水平升高。

[0238] A35. 实例 A1-A33 中任意一种方法,所述细胞被诱导后,可表达一种或多种生物复合物。

[0239] A36. 实例 A1-A29 中任意一种方法,所述一种或多种生物复合物选自表 1A、1B 和 1C。

[0240] A37. 实例 A1-A29 中任意一种方法,所述一种或多种生物复合物选自下列各组物质:

[0241] a) TNF-RI;b) 可溶性 TNF-RI;c) TNF-RII;d) 可溶性 TNF-RII;e) IL-1R 拮抗剂;和 f) IL-18 结合蛋白。

[0242] A38. 实例 A1-A37 中任意一种方法,所述细胞群落中的细胞当输给一个获得哺乳动物体时,未表现出在组织或器官中长期移植。

[0243] A39. 实例 A1-A38 中任意一种方法,所述细胞群落中的细胞维持一种或多种治疗有效复合物基本恒定的体内产生水平。

[0244] A40. 实例 39 中的方法,所述产生水平保持一段时间,该时间选自下列各组时间段:

[0245] a) 至少约 24 小时;b) 至少约 48 小时;c) 至少约 72 小时;d) 至少约 4 天;e) 至少约 5 天;f) 至少约 6 天;g) 至少约 7 天;h) 至少约 2 周;i) 至少约 3 周;j) 至少约 4 周;k) 至少约 1 个月;l) 至少约 2 个月;m) 至少约 3 个月;n) 至少约 6 个月;和 o) 至少约 1 年。

[0246] A41. 实例 A1-A40 中任意一种方法,所述患者为人。

[0247] A42. 实例 A1-A41 中任意一种方法,所述方法用于治疗下列各组疾病或功能紊乱症:

[0248] a) 神经疾病或功能紊乱症;b) 心脏疾病或功能紊乱症;c) 皮肤疾病或功能紊乱症;d) 骨骼疾病或功能紊乱症;e) 肾脏疾病或功能紊乱症;h) 泌尿生殖系统疾病或功能紊

乱症 ;i) 膀胱疾病或功能紊乱症 ;j) 内分泌疾病或功能紊乱症 ;k) 造血疾病或功能紊乱症 ;l) 胰腺疾病或功能紊乱症 ;m) 糖尿病 ;n) 眼睛疾病或功能紊乱症 ;o) 视网膜疾病或功能紊乱症 ;p) 胃肠疾病或功能紊乱症 ;q) 脾脏疾病或功能紊乱症 ;r) 免疫疾病或功能紊乱症 ;s) 自身免疫疾病或功能紊乱症 ;t) 炎症性疾病或功能紊乱症 ;u) 增生性疾病或功能紊乱症 ;和 v) 癌症。

[0249] A43. 实例 A1-A42 中任意一种方法,所述细胞经过遗传修饰。

[0250] A44. 实例 43 中的方法,所述细胞通过导入一个重组的核酸分子而得到遗传修饰。

[0251] A45. 一种制备实例 A1-A47 任意一个中单个细胞群落的过程 :

[0252] i) 从一个生物体中获得细胞群落源 ;和

[0253] ii) 体外培养所述细胞群落。

[0254] B1. 一种复合物包括自我更新型集落形成体细胞 (CF-SC) 的药物可接受混合物、或由这些细胞衍生的条件细胞培养基,以及纯化的天然生成或分离的重组胞外基质或血浆蛋白。

[0255] B2. 实例 B1 中的复合物,所述 CF-SC 衍生自骨髓。

[0256] B3. 实例 B1 或 B2 中的复合物,所述 CF-SC 来源于人。

[0257] B4. 实例 B1-B3 中的任意一种复合物,所述 CF-SC 来源于包括人在内的成年哺乳动物。

[0258] B5. 实例 B1-B4 中的任意一种复合物,所述 CF-SC 表达一种或多种表 1A、1B 和 1C 中所示的分泌蛋白。

[0259] B6. 实例 B1-B5 中的任意一种复合物,所述胞外基质或血浆蛋白由一种或多种选自下列各组分子的全长结构、支链加工异构体、蛋白酶水解片段或亚单位 :

[0260] a) 胶原蛋白 ;b) 弹力蛋白 ;c) 纤粘蛋白 ;d) 层粘蛋白 ;e) 巢蛋白 ;f) 透明质酸 ;g) 聚乙醇酸 (PGA) ;h) 纤维蛋白原 (因子 I) ;i) 纤维素 ;j) 凝血素 (因子 II) ;k) 凝血酶 ;l) 抗凝血酶 ;m) VIIa 组织因子的辅因子 (因子 III) ;n) 蛋白 C ;o) 蛋白 S ;p) 蛋白 Z ;q) 蛋白 Z 相关性蛋白酶抑制剂 ;r) 肝素因子 II ;s) 因子 V (促凝血球蛋白原,不稳定因子) ;t) 因子 -VII ;u) 因子 -VIII ;v) 因子 -IX ;w) 因子 -X ;x) 因子 -XI ;y) 因子 -XII ;z) 因子 -XIII ;aa) 血管假性血友病因子 ;ab) 激肽释放酶原 ;ac) 高分子量激肽原 ;ad) 血浆酶原 ;ae) 血浆酶 ;af) 组织血浆酶原活化因子 ;ag) 尿激酶 ;ah) 血浆酶原活化因子抑制因子 -1 ;和 ai) 血浆酶原活化因子抑制因子 -2。

[0261] B7. 实例 B1-B6 中的任意一种复合物还包括纯化的天然生成的细胞因子或趋化因子,或者分离的重组细胞因子或趋化因子。

[0262] B8. 实例 B1-B7 中的任意一种复合物,所述胞外基质、血浆蛋白、细胞因子和 / 或趋化因子来源于人。

[0263] B9. 实例 B1-B8 中的任意一种复合物,所述药物可接受混合物会形成一种半固化的或固化的基质。

[0264] B10. 运用实例 B1-B8 中任意一种复合物治疗受损组织的方法,该复合物为一种液体。

[0265] B11. 实例 B10 中的方法,该液体通过注射给药。

[0266] B12. 运用实例 B1-B9 中任意一种复合物治疗受损组织的方法,该复合物给药时为

液体,但之后形成半固态或固态基质。

[0267] B13. 实例 B10-B12 中的方法,所述组织受到损伤是下列情况导致的结果:

[0268] a) 疾病;b) 机械创伤;c) 缺血;d) 衰老;e) 烫伤;f) 细菌感染;g) 病毒感染;h) 真菌感染;和 i) 免疫系统功能失调。

[0269] B14. 实例 B13 中的方法,该受损组织为皮肤。

[0270] B15. 运用实例 B1-B9 中任意一种复合物使面部皮肤焕发青春光彩的方法。

[0271] B16. 实例 B1-B9 中任意一种复合物的使用方法,所述复合物抑制急性炎症反应。

[0272] C1. 治疗、修复、再生或愈合受损器官或组织的方法,其中包括使受损器官或组织与有效数量的自我更新型集落形成体细胞或由其产生的复合物接触,以便使受损器官或组织得到有效治疗、修复、再生或愈合。

[0273] C2. 实例 C1 中的方法,所述受损器官或组织通过下列方式与有效数量的自我更新型集落形成体细胞或由其产生的复合物接触:

[0274] a) 注射进入受损器官或组织;b) 涂用到受损器官或组织上;c) 从近轴部位向受损器官或组织注射;和 d) 沿近轴方向涂在受损器官或组织上。

[0275] C3. 实例 C1 或 C2 中的方法,该细胞来源于骨髓。

[0276] C4. 实例 C1-C3 中任意一种方法,该细胞为人体细胞。

[0277] C5. 实例 C1-C4 中任意一种方法,由所述细胞产生的细胞或复合物会抑制或减弱不利免疫应答(例如细胞介导的自身免疫),降低组织纤维化发生率(结疤),和/或抑制不利的组织重塑过程(例如心室重塑)。

[0278] C6. 实例 C1-C5 中任意一种方法,由所述细胞产生的细胞或复合物会调控炎症和/或抑制急性炎症。

[0279] C7. 实例 C1-C5 中任意一种方法,由所述细胞产生的细胞或复合物会刺激或增强血管生成作用。

[0280] C8. 实例 C1-C5 中任意一种方法,所述细胞并非以显著的或可检测的水平永久或长期植入所述的受损器官或组织。

[0281] C9. 实例 C1-C8 中任意一种方法,所述受损器官选自心脏、大脑和脊髓。

[0282] C10. 实例 C1-C8 中任意一种方法,所述受损组织选自心脏组织、神经组织(包括中枢与外周神经系统组织)和血管组织(包括大小动脉、静脉和毛细血管)。

[0283] D1. 一种复合物包括自我更新型集落形成体细胞(CF-SC)的药物可接受混合物、或由这些细胞衍生的条件细胞培养基,以及纯化的天然生成或分离的重组胞外基质或血浆蛋白。

[0284] D2. 实例 D1 中的复合物,所述 CF-SC 来源于骨髓。

[0285] D3. 实例 D1 或 D2 中的复合物,所述 CF-SC 来源于人。

[0286] D4. 实例 D1-D3 中的任意一种复合物,所述 CF-SC 来源于包括人在内的成年哺乳动物。

[0287] D5. 实例 D1-D4 中的任意一种复合物,所述 CF-SC 表达一种或多种表 1A、1B 和 1C 中所示的分泌蛋白。

[0288] D6. 实例 D1-D5 中的任意一种复合物,所述胞外基质或血浆蛋白包括选自下列各组分的一种或多种全长结构、支链加工同分异构体、蛋白酶水解片段或亚单位:

[0289] a) 胶原蛋白 ;b) 弹力蛋白 ;c) 纤粘蛋白 ;d) 层粘蛋白 ;e) 巢蛋白 ;f) 透明质酸 ;g) 聚乙醇酸 (PGA) ;h) 纤维蛋白原 (因子 I) ;i) 纤维素 ;j) 凝血素 (因子 II) ;k) 凝血酶 ;l) 抗凝血酶 ;m) VIIa 组织因子的辅因子 (因子 III) ;n) 蛋白 C ;o) 蛋白 S ;p) 蛋白 Z ;q) 蛋白 Z 相关性蛋白酶抑制剂 ;r) 肝素因子 II ;s) 因子 V (促凝血球蛋白原,不稳定因子) ;t) 因子 -VII ;u) 因子 -VIII ;v) 因子 -IX ;w) 因子 -X ;x) 因子 -XI ;y) 因子 -XII ;z) 因子 -XIII ;aa) 血管假性血友病因子 ;ab) 激肽释放酶原 ;ac) 高分子量激肽原 ;ad) 血浆酶原 ;ae) 血浆酶 ;af) 组织血浆酶原活化因子 ;ag) 尿激酶 ;ah) 血浆酶原活化因子抑制因子 -1 ;和 ai) 血浆酶原活化因子抑制因子 -2。

[0290] D7. 实例 D1-D6 中的任意一种复合物,还包括纯化的天然生成的细胞因子或趋化因子、或分离的重组细胞因子或趋化因子。

[0291] D8. 实例 D1-D7 中的任意一种复合物,所述胞外基质、血浆蛋白细胞因子和 / 或趋化因子来源于人。

[0292] D9. 实例 D1-D8 中的任意一种复合物,所述药物可接受混合物会形成半固态或固态基质。

[0293] D10. 运用实例 D1-D8 中任意一种复合物治疗受损组织的一种方法,该复合物为液体。

[0294] D11. 实例 D10 中的方法,该液体通过注射给药。

[0295] D12. 运用实例 D1-D9 中任意一种复合物治疗受损组织的一种方法,该复合物以液体形式给药,之后就形成半固态或固态基质。

[0296] D13. 实例 D10-D12 中的任意一种复合物,所述组织因下列情况而受到损伤 :

[0297] a) 疾病 ;b) 机械创伤 ;c) 缺血 ;d) 衰老 ;e) 烫伤 ;f) 细菌感染 ;g) 病毒感染 ;h) 真菌感染 ;和 i) 免疫系统功能失调。

[0298] D14. 实例 D13 中的方法,该受损组织为皮肤。

[0299] D15. 运用实例 D1-D9 中任意一种复合物使面部皮焕发青春活力的方法。

[0300] D16. 实例 D1-D9 中任意一种复合物的使用方法,所述复合物会抑制急性炎症。

[0301] D17. 治疗、修复、再生或愈合受损器官或组织的方法,其中包括使受损器官或组织与有效数量的自我更新型集落形成体细胞或由其产生的复合物接触,以便使受损器官或组织得到有效治疗、修复、再生或愈合。

[0302] D18. 实例 D17 中的方法,所述受损器官或组织通过下列方式与有效数量的自我更新型集落形成体细胞或由其产生的复合物接触 :

[0303] a) 注射进入受损器官或组织 ;b) 涂用到受损器官或组织上 ;c) 从近轴部位向受损器官或组织注射 ;和 d) 沿近轴方向涂在受损器官或组织上。

[0304] D19. 实例 D17 或 D18 中的方法,该细胞来源于骨髓。

[0305] D20. 实例 D17-D19 中任意一种方法,该细胞来源于人。

[0306] D21. 实例 D17-D20 中任意一种方法,由所述细胞产生的细胞或复合物会抑制或减弱不利免疫应答 (例如细胞介导的自身免疫),降低组织纤维化发生率 (结疤),和 / 或抑制不利的组织重塑过程 (例如心室重塑)。

[0307] D22. 实例 D12-D21 中任意一种方法,由所述细胞产生的细胞或复合物会调控炎症反应和 / 或抑制急性炎症反应。

[0308] D23. 实例 D17-D21 中任意一种方法, 由所述细胞产生的细胞或复合物会刺激或增强血管生成作用。

[0309] D24. 实例 D17-D21 中任意一种方法, 所述细胞未表现出永久或长期植入所述受阻器官或组织的显著或可检测水平。

[0310] D25. 实例 D17-D24 中任意一种方法, 所述受损器官选自心脏、大脑和脊髓。

[0311] D26. 实例 D17-D24 中任意一种方法, 所述受损组织选自心脏组织、神经组织(包括中枢和外周神经系统组织)和血管组织(包括大小动脉、静脉和毛细血管)。

[0312] D27. 诱导、增强和 / 或维持体内红细胞不断产生的一种方法。

[0313] D28. 实例 D27 中的方法, 所述诱导、增强或者维持作用通过将造血前体细胞与自我更新型集落形成细胞一起共培养实现。

[0314] D29. 实例 D28 中的方法, 所述自我更新型集落形成细胞为人体骨髓衍生体细胞(hABM-SC)。

[0315] D30. 实例 D29 中的方法, 所述 hABM-SC 来源于成年个体。

[0316] D31. 实例 D27-D29 中的任意一种方法, 所述共培养是指利用半渗透屏障使造血前体细胞和自我更新型集落形成细胞维持分隔状态, 但是又允许由所述自我更新型集落形成细胞产生的复合物穿过所述屏障进行物质交换。

[0317] D32. 实例 D27 中的方法, 所述诱导、增强或者维持作用通过共培养自我更新型集落形成细胞而实现。

[0318] D33. 实例 D32 中的方法, 所述自我更新型集落形成细胞为人骨髓衍生体细胞(hABM-SC)。

[0319] D34. 实例 D33 中的方法, 所述 hABM-SC 来源于成人。

[0320] D35. 实例 D32-D34 中的任意一种方法, 所述分离提取的复合物先经过冻干处理。

[0321] D36. 实例 D32-D34 中的任意一种方法, 所述分离提取的复合物在低温保存。

[0322] D37. 实例 D32-D34 中的任意一种方法, 所述分离提取的复合物与一种或多种药物可接受载体混合。

[0323] D38. 产生、分离、纯化和 / 或包装细胞衍生复合物和 / 或营养因子的一种方法。

[0324] D39. 产生条件培养基的一种方法, 所述培养基含血清或不含血清。

[0325] D40. 分离纯化条件培养基中组分和 / 或细胞衍生复合物的一种方法, 所述培养基含血清或不含血清。

[0326] D41. 分离、低温保存和 / 或扩增 CD34+ 脐带血细胞(CBC)的一种方法。

[0327] D42. 实例 D41 中的方法, 所述 CBC 通过悬浮培养进行增殖。

[0328] D43. 实例 D41 中的方法, 所述 CBC 通过将自我更新型集落形成细胞作为饲养层细胞与之共培养进行增殖。

[0329] D44. 实例 D43 中的方法, 所述自我更新型集落形成细胞为人骨髓衍生体细胞(hABM-SC)。

[0330] D45. 一种含葡萄糖平衡盐溶液的洗涤液(BSSD)。

[0331] D46. 实例 D45 中的洗涤液, 所述葡萄糖浓度约为 4.5%。

[0332] D47. 实例 D45 或 D46 中的洗涤液, 还包括人血清白蛋白。

[0333] D48. 实例 D47 中的洗涤液, 所述人血清白蛋白浓度约为 5%。

[0334] D49. 一种含二甲基亚砜 (DMSO) 与人血清白蛋白 (HSA) 平衡盐溶液的低温保存培养基。

[0335] D50. 实例 D49 中的低温保存培养基, 所述 DMSO 浓度约为 5%, 所述 HSA 浓度约为 5%。

[0336] E1. 一个单独的骨髓衍生细胞群落, 该细胞群落中大约有 91% 以上细胞共表达 CD49c 和 CD90, 该细胞群落分裂速率为不到 30 小时一次。

[0337] E2. 实例 E1 中的单个细胞群落, 该细胞群落来源于人骨髓。

[0338] E3. 实例 E1 或 E2 中的单个细胞群落, 该细胞群落中共表达 CD49c 和 CD90 的细胞不表达 CD34 和 / 或 CD45。

[0339] E4. 实例 E1、E2 或 E3 中任意一个的单独细胞群落, 该细胞群落中共表达 CD49c 和 CD90 的细胞还至少表达一种心脏相关性转录因子, 该转录因子选自 GATA-4、Irx4 和 Nkx2.5。

[0340] E5. 实例 E1、E2 或 E3 中任意一个的单独细胞群落, 该细胞群落中共表达 CD49c 和 CD90 的细胞还至少表达一种选自下列各组的营养因子:

[0341] a) 脑衍生神经营养因子;

[0342] b) 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C;

[0343] c) 白介素 -6 (IL-6);

[0344] d) 白介素 -7 (IL-7);

[0345] e) 白介素 -11 (IL-11);

[0346] f) 神经生长因子 (NGF);

[0347] g) 神经营养因子 -3 (NT-3);

[0348] h) 巨噬细胞趋化因子蛋白 -1 (MCP-1);

[0349] i) 基质金属蛋白酶 -9 (MMP-9);

[0350] j) 干细胞因子 (SCF); 和

[0351] k) 血管内皮生长因子 (VEGF)。

[0352] E6. 实例 E1、E2 或 E3 中任意一个的单独细胞群落, 该细胞群落中共表达 CD49c 和 CD90 的细胞还表达 p21 或 p53, p53 的表达属于相关式表达, 即每一个 18s rRNA 的 10^6 个转录子中有大约 3000 个 p53 转录子, 而 p21 也属于相关式表达, 即每一个 18s rRNA 的 10^6 个转录子中有 20,000 个 p21 转录子。

[0353] E7. 实例 E1、E2 或 E3 中任意一个的单独细胞群落, 该细胞群落在体内进行培养, 经过下列各组分裂周期:

[0354] a) 至少约 15 次群落倍增;

[0355] b) 至少约 20 次群落倍增;

[0356] c) 至少约 25 次群落倍增;

[0357] d) 至少约 30 次群落倍增;

[0358] e) 至少约 35 次群落倍增; 和

[0359] f) 至少约 40 次群落倍增。

[0360] E8. 一种制备单独骨髓衍生细胞群落的方法, 该细胞群落中大约有 91% 以上细胞共表达 CD49c 和 CD90, 该细胞群落的群落倍增速率不到 30 小时, 其中包括如下步骤:

[0361] a) 在低氧条件或低氧胁迫条件下培养该细胞群落源,产生具有附着性的细胞群落;和

[0362] b) 以接种密度约低于 2500 个细胞 / 平方厘米培养该附着细胞群落。

[0363] E9. 实例 E8 中的方法,该细胞群落来源于人骨髓。

[0364] E10. 实例 E8 或 E9 中的方法,实例 E8 中的细胞群落源培养的初始接种密度 a) 选自如下各组:

[0365] a) 约低于 75000 个细胞 / 平方厘米;和

[0366] b) 约低于 50000 个细胞 / 平方厘米。

[0367] E11. 实例 E8-E10 中任意一种方法,实例 E8 中的细胞群落源培养的接种密度 b) 选自如下各组:

[0368] a) 约低于 2500 个细胞 / 平方厘米;

[0369] b) 约低于 1000 个细胞 / 平方厘米;

[0370] c) 约低于 100 个细胞 / 平方厘米;

[0371] d) 约低于 50 个细胞 / 平方厘米;和

[0372] e) 约低于 30 个细胞 / 平方厘米。

[0373] E12. 实例 E8-E11 中任意一种方法,该低氧条件选自下列各组:

[0374] a) 约 1-10% 氧气;

[0375] b) 约 2-7% 氧气;

[0376] d) 约低于 20% 氧气;

[0377] c) 约低于 15% 氧气;

[0378] d) 约低于 10% 氧气;

[0379] e) 约低于 5% 氧;和

[0380] f) 约 5% 氧气。

[0381] E13. 实例 E8-E12 中任意一种方法,还包括培养细胞群落源之前在该细胞群落源中裂解红细胞。

[0382] E14. 实例 E8-E12 中任意一种方法,还包括培养细胞群落源之前选择一个具有一定细胞密度梯度、经过裂解处理的细胞群落。

[0383] E15. 实例 E8-E14 中任意一种方法,该细胞群落中共表达 CD49c 和 CD90 的细胞不表达 CD34 和 / 或 CD45。

[0384] E16. 实例 E8-E15 中任意一种方法,该细胞群落中共表达 CD49c 和 CD90 的细胞至少还表达一种心脏相关转录因子,该因子选自 GATA-4、Irx4 和 Nkx2.5。

[0385] E17. 实例 E8-E15 中任意一种方法,该细胞群落中共表达 CD49c 和 CD90 的细胞至少还表达一种选自下列各组的营养因子:

[0386] a) 脑衍生神经营养因子 (BDNF);

[0387] b) 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C;

[0388] c) 白介素 -6 (IL-6);

[0389] d) 白介素 -7 (IL-7);

[0390] e) 白介素 -11 (IL-11);

[0391] f) 神经生长因子 (NGF);

[0392] g) 神经营养因子 -3 (NT-3) ;

[0393] h) 巨噬细胞趋化因子蛋白 -1 (MCP-1) ;

[0394] i) 基质金属蛋白酶 -9 (MMP-9) ;

[0395] j) 干细胞因子 (SCF) ;和,

[0396] k) 血管内皮生长因子 (VEGF)。

[0397] E18. 实例 E8-E15 中任意一种方法, 该细胞群落中共表达 CD49c 和 CD90 的细胞还表达 p21 或 p53, p53 的表达属于相关式表达, 即每一个 18srRNA 的 10^6 个转录子中有大约 3000 个 p53 转录子, 而 p21 也属于相关式表达, 即每一个 18s rRNA 的 10^6 个转录子中有 20,000 个 p21 转录子。

[0398] E19. 实例 E8-E15 中任意一种方法, 该细胞群落在体内进行培养, 经过下列各组分裂周期:

[0399] a) 至少约 15 次群落倍增;

[0400] b) 至少约 20 次群落倍增;

[0401] c) 至少约 25 次群落倍增;

[0402] d) 至少约 30 次群落倍增;

[0403] e) 至少约 35 次群落倍增;和,

[0404] f) 至少约 40 次群落倍增。

[0405] E20. 实例 E1-E7 中任意一个的单独细胞群落在生产一种药物中的应用, 该药物用于治疗下列各组人类疾病:

[0406] a) 退化性疾病;

[0407] b) 急性损伤病;

[0408] c) 神经疾病;和

[0409] d) 心脏病。

[0410] E21. 实例 E1-E7 中任意一个的单独细胞群落在生产治疗人类退化性疾病或急性损伤病药物中的应用:

[0411] E22. 由人骨髓衍生的单个细胞群落, 该细胞群落中约有 91% 以上的细胞共表达 CD49c 和 CD90, 该细胞群落在低氧条件下倍增速率不到 30 小时。

[0412] E23. 实例 E22 中的单个细胞群落, 该细胞群落来源于人骨髓。

[0413] E24. 实例 E22 或 E23 中的单个细胞群落, 所述低氧条件为氧气浓度为约 1-10%。

[0414] E25. 实例 E24 中的单个细胞群落, 所述低氧条件为氧气浓度 5% 左右。

[0415] E26. 实例 E22-E25 中任意一个的单个细胞群落, 该细胞群落以接种密度约低于 2500 个细胞 / 平方厘米进行附着式培养。

[0416] E27. 实例 E22-E25 中任意一个的单个细胞群落, 所述接种密度约低于 1000 个细胞 / 平方厘米。

[0417] E28. 实例 E22-E25 中任意一个的单个细胞群落, 所述接种密度约低于 100 个细胞 / 平方厘米。

[0418] E29. 实例 E22-E25 中任意一个的单个细胞群落, 所述接种密度约低于 50 个细胞 / 平方厘米。

[0419] E30. 实例 E22-E25 中任意一个的单个细胞群落, 所述接种密度约低于 30 个细胞 /

平方厘米。

[0420] E31. 一种制备单个细胞群落的方法,该细胞群落中约有 91% 以上的细胞共表达 CD49c 和 CD90,该细胞群落的倍增速率不到 30 小时,其中包括如下步骤:

[0421] a) 从人体中吸出骨髓细胞;

[0422] b) 将骨髓吸出液中的红细胞裂解;

[0423] c) 将一个未经裂解的骨髓细胞接入一个细胞培养容器中;

[0424] d) 使未经裂解的骨髓细胞附着在表面;

[0425] e) 在 5% 氧气浓度条件下培养该附着细胞;和

[0426] f) 以 30 个细胞 / 平方厘米的接种密度对附着细胞进行继代培养。

[0427] E32. 通过实例 E31 方法可获得的单个细胞群落。

[0428] E33. 通过实例 E31 方法可获得的单个细胞群落。

[0429] E34. 一种制备单个细胞群落的方法,该细胞群落中约有 91% 以上的细胞共表达 CD49c 和 CD90,该细胞群落的倍增速率不到 30 小时,其中包括如下步骤:

[0430] a) 从人体中吸出骨髓细胞;

[0431] b) 选取一个经裂解的该细胞群落源以不同的密度进行继代培养;

[0432] c) 将该经裂解的细胞接入一个细胞培养容器中;

[0433] d) 使经裂解的骨髓细胞附着在表面;;

[0434] e) 在 5% 氧气浓度条件下培养该附着细胞;和

[0435] f) 以 30 个细胞 / 平方厘米的接种密度对附着细胞进行继代培养。

[0436] E35. 通过实例 E34 方法可获得的单个细胞群落。

[0437] E36. 通过实例 E34 方法可获得的单个细胞群落。

[0438] 举例

[0439] 例 1

[0440] 成人骨髓衍生体细胞的生物活性:

[0441] 无血清条件培养基的生产

[0442] 无血清条件培养基按下述方法进行生产,可用于测试分析,例如分泌蛋白的固相捕获(如下文所述)。将人 exABM-SC(批号 RECB-819;约 43 次群落倍增)融化并重悬于附加 4mM L- 谷氨酰胺(产品目录货号 SH30034.01.,批号 134-7944(美国犹他州 Logan 的 HYCLONE™ Laboratories 公司))的加强 DMEM(GIBCO™;产品目录货号 12491-015,批号 1216032(美国加州 Carlsbad 的 Invitrogen Corp.))或含有 4mM L- 谷氨酰胺并附加胰岛素-转铁蛋白-硒-A(ITS)(GIBCO™;产品目录货号 51300-044,批号 1349264)的 HyQ® RPMI-1640(HYCLONE™ 产品目录货号 SH30255.01,批号 ARC25868)。然后将细胞悬液接种于 T-225 平方厘米 CELLBIND™(美国纽约的 Corning 公司)培养瓶(培养表面经微波血浆处理专利技术处理,参见《美国专利号 6,617,152》)(n = 3)中,接种密度为 36 毫升培养基中 20,000 个细胞 / 平方厘米(各条件下 n = 3)。在 37℃ 温度下,于三气体湿度化培养箱(4% 氧气,5% 二氧化碳,用氮气平衡)中培养约 24 小时。在同一天添加新鲜培养基去除非附着残余细胞,然后再置于培养箱培养。第三天时,用 20 毫升 CENTRICON™ PLUS-20 离心过滤装置(美国马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore Corp 公司)对细胞培养基进行浓缩。简单地说,浓缩剂以 1140xG. 离心处理 45 分钟。将浓缩的上清转移至 2 毫升低温冻存瓶中于 -80℃

贮存。然后用 0.25% 猪胰蛋白酶 EDTA 液 (CELLGRO™; 产品目录货号 30-004-C1 (美国弗吉尼亚州 Herndon 的 Mediatech 公司)) 将细胞从培养瓶中解离下来。接着加入相同体积的含 10% 牛胎血清的细胞培养基中和胰蛋白酶。细胞计数与细胞活力分析分别用 COULTER™ AcT 10 系列分析仪 (美国加州 Fullerton 的 Beckman Coulter) 和台酚蓝包排除试验进行。进行 2D SDS-PAGE 时, 将人体 ABM-SC (批号 PCH627; 约 27 次群落倍增) 融化并重悬于补充有 4mM L-谷氨酰胺 (HYCLONE™; 产品目录货号 SH30034.01, 批号 134-7944) 的 HyQ® Minimum Essential Medium (MEM), AlphaModification (HYCLONE™; 产品目录货号 SH30265.01, 批号 ASA28110) 或附加 4mM L-谷氨酰胺 (HYCLONE™; 产品目录货号 SH30034.01, 批号 134-7944) 的 RPMI1640 (HYCLONE™; 产品目录货号 SH30255.01)。然后将细胞悬液接种于 T-225 平方厘米 CELLBIND™ 培养瓶 (n = 3) 中, 接种密度为 36 毫升培养基中 24-40,000 个细胞 / 平方厘米 (各条件下 n = 3)。在 37℃ 温度下, 于三气体湿度化培养箱 (4% 氧气, 5% 二氧化碳, 用氮气平衡) 中培养约 24 小时。在同一天添加新鲜培养基去除非附着残余细胞, 然后再置于培养箱培养。第二天, 收集条件培养基, 建立细胞库, 以 1140xG 离心处理 15 分钟以除去细胞残余, 然后将其转移至无菌离心管于 -80℃ 短期保存。

[0443] 例 2

[0444] 分泌因子的双向 (2-D) SDS PAGE 分离 (图 1)

[0445] 冻存的整套条件培养基和对照培养基 (样品) 被船运至 Kendrick Labs 公司 (威斯康辛州 Madison) 进行分析。使用前, 将样品融化后加热至室温。每个样品取大约 50 毫升进行冻干处理, 然后再溶于 200 毫升煮沸的 SDS 缓冲液 (5% 十二烷基磺酸钠, 5% β-巯基乙醇, 10% 甘油和 60mM Tris, pH6.8) 和 2 毫升超纯水中。使用 6-8,000 张 MWC0 膜, 在 pH 7.0、温度为 4℃ 的环境下根据 5mM Tris 对样品进行透析两天。最后仅用水进行透析。样品再次进行冻干处理, 再次溶于 200 毫升煮沸的 SDS 缓冲液中, 上样之前在沸水孵育箱中加热 5 分钟。

[0446] 双向凝胶电泳根据下文 O'Farrell 法 (O'Farrell, P.H., J. Biol. Chem. 250 : 4007-4021, 1975) 进行。首先用 2.0% 两性电解质载体 (pH3.5-10) (新泽西州 Piscataway 的 Amersham Biosciences) 在内径为 2.0mm 的玻璃管中进行等电点调节, 最终功率调至 20,000 伏特时。然后给每个样品中加入 50 纳克 IEF 内标 (原肌球蛋白)。该原肌球蛋白标准品用作凝胶上的参照点, 以二聚体形式迁移, 到达一个 MW 为 33,000 的较低多肽参照点, 等电点 pI 为 5.2。管中这套两性电解质载体凝胶的 pH 梯度利用表面 pH 电极确定。

[0447] 在缓冲液 0 (10% 甘油, 50mm 二硫苏糖醇, 2.3% SDS, 0.0625M Tris, pH6.8) 平衡 10 分钟后, 将各管凝胶覆盖在积层凝胶顶部, 积层凝胶本身位于 12% 丙烯酰胺凝胶板 (厚度为 1.0 毫米) 顶部。在 25mA 电流下对 SDS 凝胶板进行电泳约 5 小时。向单个琼脂糖凝胶 (琼脂糖凝胶位于管凝胶与凝胶板之间) 加样孔加入下列蛋白 (Sigma Chemical 公司) 作为分子量参照物: 肌球蛋白 (220,000D)、; 磷酸化酶 A (94,000D)、接触酶 (60,000D)、肌动蛋白 (43,000D)、碳酸酐酶 (29,000D)、和溶菌酶 (14,000D)。经银染色后这些参照分子在位于丙烯酰胺凝胶板碱性边缘显示为条带状 (Oakley et al. Anal. Biochem. 105 : 361-363, 1980)。然后将该凝胶置于两层玻璃纸 (酸性端位于左侧) 之间进行干燥 (见图 1)。如果凝胶专用于质谱分析, 就用 O'Connell 与 Stults 银染法 (O'Connell & Stults. Electrophoresis. 18 : 349-359, 1997) 染色。

[0448] 结果显示,采用这些方法时,人体 ABM-SC 可在不含动物血清条件下培养,产生富含分泌蛋白的条件培养基,这样,此类蛋白质就能够进行单独鉴定与分离。以这种方式产生的条件培养基亦能通过将表达的蛋白裂解为不同分子量范围的片段进行选择加工。蛋白浓缩与分段技术属于非常成熟的技术,用于本领域常规的普通操作中。这些技术包括亲和层析,中空纤维过滤技术、2D PAGE 技术和低吸超滤技术。

[0449] 例 3A

[0450] 人体 ABM-SC 对再生性细胞因子前体的分泌

[0451] 将人体 ABM-SC 按 6,000 个活细胞 / 平方厘米平铺在含 AFG104 的 3 个 T 形细胞培养瓶中。培养 24 小时使细胞附着并平衡后,培养基发生了彻底变化,培养瓶再孵育 72 小时。收集培养基并对其进行离心处理并贮存在 -80°C 温度下,直至使用市场上购买的 ELISA 试剂盒进行比色分析。分析分泌细胞因子释放时,培养瓶的姊妹瓶用 10 毫克 / 毫升 $\text{TNF-}\alpha$ 处理,在孵育 72 小时的最后 24 小时加入。对于每次培养,可制备、加工三瓶细胞和上清液,并取少量入库作为基本培养基和刺激培养基,分别命名为基本瓶 A、B 与 C,或刺激瓶 A、B 与 C。

[0452] 结果显示,进行继代培养时,ABM-SC 可能分泌几种治疗水平生长因子和细胞因子,这些因子已经证实可增强血管生成作用、促进炎症反应和伤口愈合。请多见图 11。因此,已有研究显示,ABM-SC 可在体外持续分泌几种细胞因子和生长因子,其中包括血管生成因子前体(例如, $\text{SDF-1}\alpha$ 、VEGF、ENA-78 和血管生成素)、免疫调节因子(例如, IL-6 和 IL-8)和疤痕抑制因子 / 创面愈合调节因子(例如, MMP-1、MMP-2、MMP-13 和活化素-A)。而且,某些因子的释放受肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF-}\alpha$) 的调节,该因子是一种已知的炎症性细胞因子,在急性组织损伤发生过程中释放。

[0453] 例 3B

[0454] 分泌因子的固相捕获与鉴定(见图 1A、1B 和 1C)

[0455] 运用 RAYBIO™ 人体细胞因子抗体芯片(美国乔治亚州 Norcross 的 RayBiotech 公司),通过固相抗体捕获蛋白芯片分析技术,从条件培养基中筛选出各种蛋白,如细胞因子、蛋白酶和可溶性受体。简言之,使用之前,将冻存的全套条件培养基融化并升温至室温。将芯片膜置于 8 孔盘(C 系列 1000)的小孔中。

[0456] 每孔加入 2 毫升 1X 封闭缓冲液(RayBiotech 公司),然后在室温下孵育 30 分钟以封闭芯片膜。然后从每个容器中将封闭缓冲液倒出,再将芯片膜与条件培养基一起于在室温下孵育 1 小时(用缓冲液按 1 : 10 稀释)。新鲜细胞培养基被用作替代 PBS 作为阴性对照。然后将样品从每个容器中倒出,用 2 毫升 1X 洗涤缓冲液 I(RayBiotech 公司)在室温下洗涤 3 次,然后震荡 5 分钟。接着将芯片膜置于一个小孔中,加入 1 毫升用 1X 封闭缓冲液配制的生物素结合二抗溶液,于室温下孵育 1 小时。然后用洗涤缓冲液将芯片洗涤几次。HRP 标记链霉亲和素溶液用 1X 封闭缓冲液按 1 : 1000 稀释后取 2 毫升与每个芯片膜混合,然后在室温下孵育 2 小时。然后用 1X 漂洗缓冲液将膜洗涤几次。按照每个厂商使用说明(RayBiotech, 公司)配制化学发光检测试剂,并将其涂于每个膜上,并在室温下孵育 2 分钟。然后将膜置于一张塑料纸上,有蛋白一面朝上。再用另一张塑料纸盖在膜的反面。通过捋平塑料纸排走气泡。接着将膜暴露于 X 光薄膜(Kodak X-OMAT AR™ 膜),最后用膜显影剂处理膜。

[0457] 表 1A、1B 和 1C 列出了在无血清细胞培养基中继代培养时,人体 ABM-SC 分泌的更多细胞因子、生长因子、可溶性受体和基质蛋白酶。该培养基为附加 4mL- 谷氨酰胺的培养基上清浓缩液 #1 = 加强 DMEM(Gibco™)。培养基上清浓缩液 #2 = 含有 4mM L- 谷氨酰胺的 RPMI-1640 和附加胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 -A(Gibco™) 的 HEPES 液 (HyClone)。

[0458] 结果表明,参与组织再生和免疫系统调节的多种营养因子和可溶性受体由 ABM-SC 在这些条件下培养时产生。很显然,早期的实验证实,给基本培养基补加胰岛素、转铁蛋白和硒是使分泌蛋白达到表 1A、1B 和 1C 所示水平所必需的。表 1A、1B 和 1C 所示的蛋白水平通过运用 RAYBIO™ 人细胞激素抗体微阵列 (RayBiotech 公司) 测定得到。该水平用平均光密度值 (O.D.) 表示。(待测样品, N = 2 ; 对照, N = 4)。标为 a(+) 的值意味着特定分析物的 O.D 值大于处于相关对照平均 O.D 值之上的两个标准差。标为 a(-) 的值意味着特定分析物的 O.D 值不大于处于相关对照平均 O.D 值之上的两个标准差。

[0459] 表 1A

[0460]

细胞因子	培养基上清浓缩液 #1	培养基上清浓缩液 #2
正控 (POSITIVE CTL)	11,020 (平均 O.D.)	11,127 (平均 O.D.)
负控 (NEG CTL)(背景)	2,360.00	2,271.00
血管生成素 (Angiogenin)	5800.5 (+)	4651 (+)
BDNF	5855.5 (+)	3587 (+)
BLC	3852(+)	3164.5 (+)
BMP-4	3299 (+)	2610 (+)
BMP-6	2359.5 (-)	2290.5 (-)
CK β 8-1	2408.5 (-)	2426 (-)
CNTF	2655.5 (+)	2663 (+)
EGF	3932.5 (+)	2517 (+)
嗜酸粒细胞趋化因子	2527 (+)	2488 (+)
嗜酸粒细胞趋化因子 -2	2467 (-)	2452.5 (+)
嗜酸粒细胞趋化因子 -3	4564 (+)	4450 (+)
FGF-6	2863.5 (+)	2883.5 (+)
FGF-7	2328 (-)	2374.5 (-)
Flt-3 配体	2661 (+)	2414.5 (-)
Fractalkine(一种趋化因子)	2432.5 (-)	2379.5 (-)
GCP-2	2546.5 (+)	2270 (-)
GDNF	2299.5 (-)	2208.5 (-)
GM-CSF	2294 (-)	2129 (-)
I-309	2431.5 (-)	2222 (-)
IFN-γ	2807.5 (+)	2848.5 (+)
IGFBP-1	3192 (+)	4528.5 (+)
IGFBP-2	4813.5 (+)	4244 (+)

[0461]

IGFBP-4	4640 (+)	4222.5 (+)
IGF-I	2206.5 (-)	2238 (-)
IL-10	2225.5 (-)	2200.5 (-)
IL-13	2582 (+)	2473 (+)
IL-15	2472.5 (-)	2622.5 (+)
IL-16	2339.5 (-)	2229.5 (-)
IL-1 α	2698.5 (+)	2571.5 (+)
IL-1 β	2276 (-)	2253 (-)
IL-1ra	2609 (+)	2505.5 (+)
IL-2	2523.5 (+)	2381 (-)
IL-3	2346 (-)	2270 (-)
IL-4	2591 (+)	2402 (+)
IL-5	3159 (+)	3808 (+)
IL-6	45570 (+)	40260.5 (+)
IL-7	7336.5 (+)	5805 (+)
瘦素	4187 (+)	3733.5 (+)
LIGHT	3689.5 (+)	3378.5 (+)
MCP-1	9925.5 (+)	5561 (+)
MCP-2	3117.5 (+)	2481.5 (+)
MCP-3	2532 (+)	2382 (-)
MCP-4	2702.5 (+)	2694 (+)
M-CSF	2387 (-)	2381.5 (-)
MDC	2414.5 (-)	2510.5 (+)
MIG	2344 (-)	2342.5 (-)
MIP-1 δ	2324 (-)	2259.5 (-)
MIP-3 α	2323.5 (-)	2261.5 (-)
NAP-2	2517.5 (+)	2467.5 (+)
NT-3	2973.5 (+)	3205.5 (+)
PARC	2668 (+)	2630 (+)
PDGF-BB	2580.5 (+)	2780 (+)
RANTES	2803 (+)	2760 (+)
SCF	2765 (+)	2701.5 (+)
SDF-1	3721 (+)	2562 (+)
TARC	2488 (-)	2395 (-)
TGF- β 1	2381 (-)	2311 (-)
TGF- β 3	2422 (-)	2531 (+)
TNF- α	2243 (-)	2321 (-)
TNF- β	2355 (-)	2410.5 (-)

[0462] 表 1B :

[0463]

细胞因子	培养基上清浓缩液 #1	培养基上清浓缩液 #2
正控 (POSITIVE CTL)	12,318 (平均 O.D.)	11,936 (平均 O.D.)
负控 (NEG CTL)	2,452.00	2,392.00

[0464]

Acrp30	2539.5 (+)	2436.5 (-)
AgRP	2670 (+)	2494 (-)
血管生成素-2	3372 (+)	2656.5 (+)
Amphiregulin	2692 (+)	2447 (-)
axl	3398.5 (+)	3438.5 (+)
bFGF	2915 (+)	2901.5 (+)
β -NGF	2573.5 (+)	2544 (+)
BTC	2653.5 (+)	2554.5 (+)
CCL28	2706.5 (+)	2553.5 (+)
CTACK	3502 (+)	3217 (+)
dtk	2610.5 (+)	2512 (+)
EGF-R	3057.5 (+)	2767.5 (+)
ENA-78	2630.5 (+)	2503 (+)
Fas/TNFRSF6	3312 (+)	3322.5 (+)
FGF-4	2711 (+)	2650.5 (+)
FGF-9	2770 (+)	2538.5 (+)
G-CSF	3950.5 (+)	3951 (+)
GITR 配体	2973.5 (+)	3107.5 (+)
GITR	3198 (+)	2935 (+)
GRO	29446.5 (+)	10214 (+)
GRO- α	7351 (+)	3553.5 (+)
HCC-4	3241 (+)	2720.5 (+)
HGF	5535 (+)	3936.5 (+)
ICAM-1	3043 (+)	2701.5 (+)
ICAM-3	2621.5 (+)	2427 (-)
IGF-BP-3	3392 (+)	3190.5 (+)
IGF-BP-6	5858 (+)	6111 (+)
IGF-I SR	2737.5 (+)	2757 (+)
IL-1 R4/ST2	3463.5 (+)	3235.5 (+)
IL-1 RI	2522.5 (+)	2401 (-)
IL11	2444.5 (-)	2273 (-)
IL12-p40	2584 (+)	2536 (+)
IL12-p70	2612 (+)	2618 (+)
IL17	2610.5 (+)	2555.5 (+)
IL-2 Ra	2491 (-)	2441.5 (-)
IL-6 R	3202 (+)	2836 (+)
IL8	24199.5 (+)	17594.5 (+)
I-TAC	3898 (+)	3564 (+)
人淋巴细胞趋化因子	3415.5 (+)	3166 (+)
MIF	3743 (+)	3524 (+)
MIP-1- α	2792 (+)	2747.5 (+)
MIP-1- β	2638.5 (+)	2523 (+)
MIP-3- β	2495.5 (-)	2377 (+)
MSP-a	2524.5 (+)	2394 (-)
NT-4	2735 (+)	2635 (+)
猴子骨保护素	4183.5 (+)	3399 (+)
抑瘤素	2610 (+)	2508 (-)
PlGF	2705 (+)	2493 (-)
sgp130	3232 (+)	2866.5 (+)

[0465]

sTNF RII	3124 (+)	3127 (+)
sTNF-RI	9981 (+)	7929.5 (+)
TECK	2887.5 (+)	2851 (+)
TIMP-1	8718 (+)	9342.5 (+)
TIMP-2	11927 (+)	12602 (+)
TPO	3712 (+)	3141.5 (+)
TRAIL-R3	3129 (+)	3051 (+)
TRAIL-R4	3417 (+)	3381 (+)
uPAR	9557.5 (+)	8158.5 (+)
VEGF	8587.5 (+)	6851 (+)
VEGF-D	3477 (+)	3190.5 (+)

[0466] 表 1C：

[0467]

细胞因子	培养基上清浓缩液 #1	培养基上清浓缩液 #2
正 (POS)	16,092 (平均 O.D.)	15,396 (平均 O.D.)
负 (NEG)	2,338	1,747
活化素-A	23239.5 (+)	18339 (+)
ALCAM	14185.5 (+)	15463.5 (+)
B7-1 (CD80)	2983.5 (+)	2222.5 (+)
BMP-5	2770.5 (+)	2011.5 (+)
BMP-7	2564 (+)	1828 (-)
心营养素 (Cardiotrophin) -1	2816.5 (+)	2097 (+)
CD14	3556 (+)	2334.5 (+)
CXCL-16	4108.5 (+)	2559 (+)
DR6 (TNFRSF21)	3477 (+)	2312 (+)
Endoglin	3070 (+)	2135 (+)
ErbB3	3366 (+)	2313.5 (+)
E-选择素	2846.5 (+)	1918 (+)
Fas-配体	3531.5 (+)	2943.5 (+)
ICAM-2	3158.5 (+)	2155.5 (+)
IGF-II	3212 (+)	2395.5 (+)
IL-1 R II	2855 (+)	1834 (-)
IL-10 Rb	2780 (+)	1916 (+)
IL-13 Ra2	2559.5 (+)	1693 (-)
IL-18 BPa	2921 (+)	1881 (-)
IL-18 Rb	3238.5 (+)	2387 (+)
IL-2 Ra	3666 (+)	2316.5 (+)
IL-2 Rb	3001 (+)	2083.5 (+)
IL-2 Rg	3121 (+)	2185.5 (+)
IL-21R	3567.5 (+)	2534.5 (+)
IL-5 Ra	3084.5 (+)	2237 (+)
IL-9	3676 (+)	2324.5 (+)
IP-10	3300.5 (+)	2262.5 (+)
LAP	6202 (+)	5383.5 (+)
瘦素 R	3487 (+)	2791 (+)
LIF	3486.5 (+)	2400.5 (+)
L-选择素	3036.5 (+)	2160 (+)

[0468]

M-CSF R	3140 (+)	2330.5 (+)
MMP-1	3469 (+)	2499 (+)
MMP-13	3083.5 (+)	2316.5 (+)
MMP-9	3058.5 (+)	2370 (+)
MPIF-1	2974 (+)	2274.5 (+)
NGF R	2887.5 (+)	2355 (+)
PDGF-AA	4130 (+)	3423.5 (+)
PDGF-AB	3191.5 (+)	2278.5 (+)
PDGF Ra	4430 (+)	4027 (+)
PDGF Rb	3768 (+)	2784 (+)
PECAM-1	4071.5 (+)	3450 (+)
催乳素	3199.5 (+)	2151 (+)
SCF R	3431.5 (+)	2668.5 (+)
SDF-1b	2268.5 (-)	2156 (+)
Siglec-5	2691 (+)	2160.5 (+)
TGF-a	3058.5 (+)	2388.5 (+)
TGF b2	3316 (+)	2583 (+)
Tie-1	2883 (+)	3178 (+)
Tie-2	3565 (+)	3802.5 (+)
TIMP-4	6468 (+)	6248 (+)
VE-钙粘附素	3164.5 (+)	2428 (+)
VEGF R2	4030.5 (+)	3003 (+)
VEGF R3	3200 (+)	2651.5 (+)

[0469] 例 4

[0470] 成人骨髓衍生体细胞的生物活性：分泌因子增强的体外神经生成（表 2）

[0471] 首先，用 0.1N 乙酸重悬大鼠尾部胶原蛋白 (Sigma Chemical) 配制胶原蛋白的储备液，使其最终浓度为 3.0 毫克 / 毫升。然后以 Bell 等描述的方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 76, no. 3, pp. 1274-1278, 1979 年 3 月) 为基础稍作改进（如本文所述）制备胶原蛋白培养基。简言之，通过将大鼠尾部胶原蛋白溶液与附加 5mM L- 谷氨酰胺 (CELLGRO™) 的 DMEM 5X(JRH Biosciences)、抗生素 - 抗真菌溶液 (CELLGRO™)、与缓冲液 (0.05N NaOH(Sigma Chemical)、2.2% NaHCO₃(Sigma Chemical))、和 60mM HEPES(JRH Biosciences) 按 4.7 : 2.0 : 3.3 比例混合配制胶原蛋白培养基。

[0472] 向 24 孔培养板的每个小孔加入 500 微升胶原蛋白细胞悬液。接着将 24 孔培养板在 37℃ 湿化三气培养箱 (4% 氧气, 5% 二氧化碳, 与氮气平衡) 中放置 1 小时, 使胶原蛋白溶液凝固。将冻存的大鼠 PC-12 细胞融化, 用附加 4mM L- 谷氨酸的 RPMI-1640 和附加胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 -A(GIBCO™) 的 HEPES (HYCLONE™) 洗涤, 再以 350xg 于 25℃ 离心处理 5 分钟。用同样的溶液重悬细胞团至浓度 75,000 个活细胞 / 毫升, 细胞悬液中加入或不加 136 纳克 / 毫升大鼠 β -NGF(Sigma Chemical)、1 : 50 稀释的非条件浓缩 RPMI-1640/ITS 培养基 (作为阴性对照) 和 1 : 50 稀释的条件浓缩 RPMI-1640/ 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 -A(ITS) 培养基 (条件培养基的制备如例 1 所述, 条件与非条件阴性对照培养基的浓缩同例 1 所述)。然后, 将 1 毫升细胞悬液均匀分散在凝胶 (1 毫升凝胶) 的表面, 每列 2 个凝胶, 然后通过相差显微镜验证。接着将培养板置于 37℃ 湿化三气培养箱 (4% 氧气、5% 二氧化碳, 与氮气平衡) 中培养。每 3 天用新鲜培养基更换用过的培养基一次。在第 10 天拍照。

[0473] 这些结果表明, 当添加由人体 ABM-SC 产生的条件培养基时, 由 NGF 诱导 PC12 分化

为神经元的作用将极大地增强。有趣的是,当只添加条件培养基时,按照估测的轴突和神经突的数量,神经分化的程度却不明显。可是在只含 NGF 条件下却能观察到明显生长的神经突,在这种培养物种加入条件培养基显著增加了神经突的数量和长度。我们实验室之前的研究工作显示,给 RPMI 培养基添加胰岛素、转铁蛋白和硒对于 PC12 在所有报道的测试实验条件下是否分化为神经元至关重要。这些数据表明,由人体 ABM-SC 制备的条件培养基含有某些组分,可促进或诱导神经突发育的水平高于只用 RPMI/ITS 培养基或用含 NGF 的 RPMI/ITS 培养基。

[0474] 例 5

[0475] 成人骨髓衍生体细胞的生物活性:对丝裂原诱导 T 细胞增殖的体外抑制作用

[0476] 将人体 ABM-SC(批号 RECB801,群落倍增约 18 次)和 exABM-SC(RECB906,群落倍增约 43 次)平铺在 75 平方厘米培养瓶中,其中含附加 4mM 谷氨酰胺和 10% 经血清选择并经 γ 射线处理的牛胎血清 (HYCLONE™) 的完全培养基 (Minimal Essential Medium-Alpha(HYCLONE™),细胞浓度为 6000 个活细胞 / 平方厘米,并将其置于湿化三气培养箱中 (4% 氧气、5% 二氧化碳,与氮气平衡) 在 37℃ 下培养。24 小时后,吸出原有培养基,重新加入 15 毫升新鲜培养基。再将人间质干细胞 (hMSC,产品目录货号 PT2501,批次编号 6F3837;购自 Cambrex Research Bioproducts,现隶属于瑞士 Basel 的 Lonza 集团) 平铺在 75 平方厘米培养瓶中,使其浓度为 6000 个活细胞 / 平方厘米,培养瓶中含 15 毫升间质干细胞生长培养基 (MSCGM™,瑞士 Basel 的 Lonza 集团),并置于湿化培养箱 (氧气浓度与大气相同,二氧化碳浓度为 5%) 在 37℃ 下培养。24 小时后,倒出已用过培养基,加入 15 毫升新鲜 MSCGM™。培养 96 小时后收集人体 ABM-SC(hABM-SC) 和 hMSC。将收集到的 hABM-SC 和 hMSC 平铺在 96 孔圆底培养板中,细胞浓度为 25,000 个活细胞 / 毫升,孔中含 RPMI 完全培养基 (HYCLONE™)。人外周血单核细胞 (PBMC) 用 1.25 μ M Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) 标记,并以 250,000 个细胞 / 孔在含 hMSC(批号 RECB801,批号 RECB906 hABM-SC) 或仅含 RPMI 的完全培养基中培养。要刺激 T 细胞扩散,已使用 2.5 或 10 毫克 / 毫升 Phytohaemagglutinin (Sigma Chemical) 对其进行菌体培养。72 小时后收集细胞,并按照各生产商使用说明用 CD3-PC7 抗体 (Beckman Coulter) 染色,然后利用 FlowJo 8.0 软件 (Tree Star 公司, Ashland, OR) 在 Beckman FC 500 血细胞计数器上对其进行分析。仅分析 CD3+ 细胞获取分裂指数。见图 3。

[0477] 结果表明,exABM-SC 具有抑制 T 细胞活化与增殖作用,因此,可抑制 T 细胞介导的移植排斥反应、缓解涉及 T 细胞功能失调的自身免疫病,或诱导对其他可产生免疫应答皮肤产品的免疫耐受,故可应用于治疗。因而,可以预见,同种异体人 exABM-Sc 或其产生的复合物可用于治疗等待外科手术移植同种异体皮肤产品烫伤患者。在这样的实例中,首先用 exABM-SC 或其产生的复合物治疗开放的创面,通过刺激宿主细胞迁移至受伤部位,不仅有助于创面床的重建,而且可提供同种异体皮肤或皮肤取代物长期移植的环境条件。

[0478] 例 6

[0479] 用于体内给药的猪 ABM-SC 在液态载体中的重建

[0480] 猪 ABM-SC 以 60 个细胞 / 平方厘米接种,第 4 天时更换培养液,总共培养 6 天。采集并冻存细胞直至下次使用。将冻存的猪 ABM-SC 融化,用 DPBSG (附加 4.5% 葡萄糖的 Dulbecco 磷酸盐缓冲液 (CELLGRO™)) 洗涤,接着以 350xg 于 25℃ 离心处理 5 分钟。在 DPBSG

中重悬细胞,使其浓度为大约 50,000 个细胞/微升。运用 COULTER™ AcT 10 系列气体分析仪(加州 Fullerton 的 Beckman Coulter)和台酚蓝排除法分别进行对细胞计数和细胞活力分析。然后将细胞悬液转至一个 1 毫升结核菌素注射器中。

[0481] 例 7

[0482] 成年动物骨髓衍生体细胞的生物活性:用同种异体猪 ABM-SC 治疗切口创面

[0483] 将两只体重介于 57 千克至 78 千克之间的 Yucatan 猪麻醉后准备做无菌手术。用外科手术刀片在这两只动物(编号 3 与 4)的两侧沿着脊柱两旁和胸部皮肤切出四个切口创面,这一过程历时约 50 分钟,共得到 8 个创面。将浸泡过肾上腺素的无菌纱布插入受伤部位进行止血。大约 10-20 分钟后取掉纱布,每个创面用单剂量猪 ABM-SC 处理,在切口周围形成 12 个均匀分布的独立注射部位,在其创面床再额外涂抹 10-300 微升细胞液。

[0484] 按同样方法在对照创面只注射载体溶液(DPBSG)。然后用 Steri-Strips™(3M)缝合伤口,给动物盖上保护性铝制外套。每天检查几次该外套,确保其处于合适位置。每天监测创面用敷质,在第 0、1、3、5 和 7 天拍摄其变化情况。第 7 天时以安乐死方式处死动物,观察其组织病理学变化。组织用福尔马林固定和石蜡镶嵌制成切片,然后用 H&E 染色。由对治疗组不知情的兽医病理学专家进行组织形态学打分。

[0485] 治疗 7 天后,经同种异体猪 ABM-SC 处理的坏死部位几乎未显示出肉眼可见的疤痕(见图 4),而用载体处理的坏死部位则表现出可见的疤痕。创面的组织形态学分析显示,在用 ABM-SC 处理的组织中组织巨噬细胞(组织细胞)明显减少,而在其他未进行组织学估分的组中均未见明显变化。

[0486] 当对相同组织的再次上皮化(总指示物创面愈合率)程度打分时,经 ABM-SC 处理的组织其上皮细胞数目显著增加,在切口部位形成群落(见图 5)。

[0487] 例 8

[0488] 以液态、半固态或固态形式进行体内给药的人体 ABM-SC 胶原蛋白载体的生物活性(见图 6-9)

[0489] 当在胶原蛋白生物可降解载体中重建以及在 4℃ 下保存时,人体 ABM-SC(批号 PCH610;群落倍增约 27 次)至少仍可存留 24 小时的高细胞活力(如凝胶收缩试验中的细胞生物活性结果)。如果以这种方式保存,胶原蛋白溶液将维持液态,并使细胞维持悬浮状态,且活力无明显丧失(见图 6)。该细胞的生物活性可利用体内创面修复试验进行测定。进行这种试验时,首先用 0.1N 乙酸重悬大鼠尾部胶原蛋白(Sigma Chemical)配制胶原蛋白储备液,使其终浓度为 3.0 毫克/毫升。以 Bell 等描述的方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 76, no. 3, pp. 1274-1278, 1979 年 3 月)为基础稍作改进,制备胶原蛋白培养基。简言之,通过将大鼠尾部胶原蛋白溶液与附加 5mM L-谷氨酰胺(CELLGRO™)的 DMEM 5X(JRH Biosciences)、抗生素-抗真菌溶液(CELLGRO™;产品目录货号 30-004-C1)与缓冲液(0.05N NaOH(Sigma Chemical)、2.2% NaHCO₃(Sigma Chemical))和 60mM HEPES(JRH Biosciences)按 4.7 : 2.0 : 3.3 比例混合配制胶原蛋白培养基。将冻存的人骨髓衍生体细胞(hABM-SC)融化,然后用 DMEM1X 洗涤,以 350xg 于 25℃ 离心处理 5 分钟。将细胞团重悬于 DMEM 1X,使其浓度为约 72,000 个细胞/微升。将 50 微升细胞悬液加到 2 毫升胶原蛋白培养基中,并使其分散(即,用移液管上下吹吸,获得胶原蛋白培养基的均匀悬液),产生细胞终浓度为 1800 个细胞/微升的细胞悬液。然后将该细胞悬液在 4-8℃ 下保存过夜。第

二天,将细胞悬液由 15 毫升锥形管倒出并平铺在 24 孔培养板内,大约 500 微升 / 孔。将该培养板置于 37℃ 湿化三气培养箱 (4% 氧气、5% 二氧化碳,与氮气平衡) 中孵育 1 小时,使胶原蛋白凝固为半固态凝胶。然后用可废弃无菌药铲 (VWR) 将凝胶从 24 孔板中移除,转至 12 孔板中。接着给每个小孔加入 1.0 毫升 DMEM 1X,使凝胶浮于溶液中。对于阴性对照,制备凝胶时不加入细胞。每种条件接种 3 个孔 ($n = 3$)。

[0490] 为了评估凝胶收缩的剂量依赖性有多强,进行了相同的试验,其中人 exABM-SC (批号 RECB819; 群落倍增约 43 次) 在融化后立即用胶原蛋白溶液进行重建 (见图 7)。首先,用 0.1N 乙酸重悬大鼠尾部胶原蛋白 (Sigma Chemical) 配制胶原蛋白的储备液,使其最终浓度为 3.0 毫克 / 毫升。然后以 Bell (1979 年) 等描述的方法为基础稍作改进 (如本文所述) 制备胶原蛋白培养基。简言之,通过将大鼠尾部胶原蛋白溶液与附加 5mM L- 谷氨酰胺的 DMEM 5X (JRH Biosciences)、抗生素 - 抗真菌溶液 (CELLGRO™)、缓冲液 (0.05N NaOH (Sigma Chemical)、2.2% NaHCO₃ (Sigma Chemical))、和 60mM HEPES (JRH Biosciences) 按 4.7 : 2.0 : 3.3 比例混合配制胶原蛋白培养基。将冻存的成人骨髓衍生体细胞 (hABM-SC) 融化后,用 DMEM 1X 洗涤,在 25℃ 以 350xg 离心处理 5 小时。将细胞团重悬于 DMEM 1X,使其浓度为约 40,000 个活细胞 / 微升、80,000 个活细胞 / 微升和 200,000 个活细胞 / 微升。将 50 微升每种细胞悬液加入到 2 毫升胶原蛋白培养基中,轻轻打散。取 500 微升胶原蛋白细胞悬液加入到 24 孔培养板的每个孔中。然后将此培养板置于 37℃ 湿化三气培养箱 (4% 氧气、5% 二氧化碳,与氮气平衡) 中孵育 1 小时,使胶原溶液固化。然后用可废弃无菌药铲 (VWR) 将凝胶从 24 孔板中移除,转至 12 孔板中。接着给每个小孔加入 1.0 毫升 DMEM 1X,使凝胶浮于溶液中。

[0491] 对于阴性对照,运用最高浓度 hABM-SC (5×10^6 / 毫升) (细胞经热灭活处理 (消除生物活性) 时除外) 按上述方法制备凝胶。首先,通过将 DMEM 1X 培养基细胞初始悬液在含水加热器中加热 40 分钟 (热转移),直至 70℃,最终获得热灭活的细胞。每种情况接种 3 个孔 ($n = 3$)。

[0492] 为了确定凝胶随时间收缩的程度,初始表面积百分比根据用平台式扫描仪在 0、24、48 和 72 小时捕获的数字图像计算得到。从每个图像可看出,凝胶的直径为水平方向和垂直方向的测定值,然后取平均值。结果表明,凝胶收缩的速率和程度均表现出剂量依赖性 (见图 7)。

[0493] 为了确定由人体 ABM-SC 在半固体凝胶中产生的特定分泌蛋白的水平,对从凝胶周围液体培养基中收集的细胞培养上清液进行酶联免疫吸附试验 (在培养的第 3 天) (ELISA) (见图 8)。将上清液转移至 15 毫升无菌锥形管中,以 1140xg 离心处理 15 分钟,去掉细胞残留。然后将上清转移至 2 毫升冷冻瓶中,移至 -80℃ 冰箱短期保存。在实验当天,使用前将冻存的上清融化使其自然升至室温。然后进行 ELISA 分析以检测 IL-6、VEGF、活化素 -A、MMP-1 前体和 MMP-2 ELISA (按照厂商的使用说明进行操作,所有试剂盒均购自 R&D Systems 公司 (美国明尼苏达州 Minneapolis))。结果证实,营养因子的治疗相关水平可由这些半固体新组织产生,并受细胞浓度调节的控制。在这些测定的营养因子中,仅含热灭活细胞的培养物中观察到可检测水平。实验条件之间的统计学比较分析由单向 ANOVA 确定 (***) ($p < 0.001$)。

[0494] 人体 ABM-SC 亦可在胶原蛋白溶液中得到重建,形成较大的半固体结构,可被用作

营养治疗剂（见图 9）。构建这种结构时，首先，用 0.1N 乙酸重悬大鼠尾部胶原蛋白（Sigma Chemical）配制胶原蛋白的储备液，使其最终浓度为 3.0 毫克 / 毫升。通过将大鼠尾部胶原蛋白溶液与附加 5mM L- 谷氨酰胺（CELLGRO™）的 DMEM 5X（JRH Biosciences）、抗生素 - 抗真菌溶液（CELLGRO™）和缓冲溶液（0.286N NaOH（Sigma Chemical）、1.1% NaHCO₃（Sigma Chemical））及 100mM HEPES（JRH Biosciences）按 6 : 2 : 2 比例混合配制液体胶原蛋白培养基。将冻存的 hABM-SC 融化后用 1X DMEM 洗涤，再以 350xg 于 25℃ 离心处理 5 分钟。细胞团用 1X DMEM 重悬，浓度约为 90,000 个细胞 / 微升。取约 1.1 毫升细胞悬液加入 20 毫升胶原蛋白培养基中，轻轻混匀，获得终浓度为 5×10^6 个细胞 / 毫升的细胞悬液。胶原蛋白的终浓度为 1.8 毫克 / 毫升。然后将该细胞悬液混入 10 厘米 Petri 碟（成形碟）中。在胶原溶液中分散的细胞有效剂量约为 100×10^6 个活细胞。在胶原溶液中分散的细胞有效剂量约为 100×10^6 个活细胞。然后将含细胞悬液的 10 厘米成形碟置于湿化 37℃ 培养箱（5% 二氧化碳）中孵育 1 小时，使胶原溶液凝固。然后从 10 厘米成形碟中小心取出该半固体凝胶，将其移至一个 15 厘米 Petri 碟（培养碟）中来拍照。

[0495] 为了构建衍生自人体 ABM-SC 和胶原蛋白的固体样新型组织，将上述半固体结构放回 37℃ 湿化细胞培养箱（5% 二氧化碳）中再孵育 2 天（见图 10）。形成固体样新型组织时（胶原蛋白的新型组织终浓度为 1.4 毫克 / 毫升，而不是原来的 1.8 毫克 / 毫升），将用上述方法制备的半固体凝胶小心从 10 厘米成形碟边缘取下来，再将其浮于一个 15 厘米培养碟中，该碟加有 82 毫升含抗生素 - 抗真菌溶液（CELLGRO™）的 1X DMEM。将此半固体凝胶转至 37℃ 湿化细胞培养箱（5% 二氧化碳）中再孵育 48 小时，这样有利于基质重塑，形成固体氧组织结构，且不含起始胶原底物。然后将固体样新型组织从 15 厘米培养碟中取下来拍照（见图 10A 和 10B）。使用马森三色染色法对该新型组织进行组织学分析，结果证实，该基质富含新合成的人胶原蛋白和蛋白聚糖（见图 10C）。通过此染色法处理后，对照胶原凝胶未经染色。胶原蛋白与蛋白聚糖被染成蓝色。这些研究的结果表明，冻存的 ABM-SC 储备液可在融化后立即进行分散操作，然后在液体胶原蛋白培养基中重建后能以液体细胞悬液、半固体结构或固体氧新型组织用于治疗。当用此种方式制备并在约 4-10℃ 下保存时，该细胞悬液将保持液态，并维持 24 小时以上的细胞活力。采用此种方法形成临床应用 ABM-SC 配方，这将为临床医师提供细胞给药的巨大自由度。细胞悬液能以液体注射剂形式给药，或者也能在创面床局部涂用。在后一种情况下，液态细胞悬液将参与创面表面组织形成，然后凝固为半固体结构（例如保温到约 37℃）。此外，细胞悬液还可以此种方式使用，形成半固体或固体样新型组织。

[0496] 这些研究数据还显示，当用该法制备时，所产生的复合物均具有对介导各种类型创面、尤其是皮肤创面修复所必需的生物活性。

[0497] 因此，ExCF-SC（例如 exABM-SC）或由在液体胶原蛋白培养基中制备的此类细胞产生的复合物可用于局部治疗开放创面或以注射剂形式用作皮肤填充物，以达到面部美容的效果。

[0498] 在这种半固体形势下，ExCF-SC（例如 exABM-SC）或由此类细胞产生的复合物可用于局部治疗皮肤受到完全损伤并经外科手术去除皮肤的重度烫伤患者，故可作为皮肤取代物。

[0499] 由 ExCF-SC（例如 exABM-SC）产生的固体新型组织在外科手术中可作为人尸皮肤

(ALLODERM™)、猪皮肤 (PERMACOL™) 和其他动物衍生组织 (INTEGRA™) 的备选产品。

[0500] 而且,这些数据还表明,这些产品的疗效均能通过改变细胞或由这些细胞产生的复合物的剂量而得到控制。

[0501] 例 9

[0502] hABM-SC 治疗大鼠心脏功能的改善

[0503] 将人体 ABM-SC 用于心肌梗塞动物模型的研究表明,通过刺激血管生成,减少组织纤维化发生,CF-SC(例如 ABM-SC)可改善心脏功能并增强心脏受损组织的修复。请参见图 15。通过阻塞一条冠状动脉构建急性心肌梗塞大鼠模型,结果使其心脏组织发生坏死(即心脏部分区域受损)。给受到损伤的大鼠心内注射 hABM-SC 或载体。

[0504] 心脏功能测定方法:通过用中线胸骨切开术给左前降支(LAD)冠脉周围放置永久性丝线结扎装置,Sprague-Dawley 雌雄大鼠(约 3 个月大)接受了实验性心肌梗塞的模型诱导。诱导手术后 5 天,对大鼠开始进行标准的环孢菌素 A 治疗,该治疗程序贯穿研究的整个过程。在梗塞发生后的第 7-8 天,对大鼠进行麻醉,实施插管术,使肋间切口创面暴露于心尖。通过心室壁插入一个超声 Millar 导管,记录大约 30-60 秒期间的血压测量值。梗塞产生与血压/时间测量这一心脏功能测定模型属于标准模型,其特征为,细胞治疗心脏功能的疗效能够被测定(例如,参见 Müller-Ehmsen, et al., Circulation., 105(14): 1720-6(2002))。待测复合物的给药通过配有 30 间距低死腔针的 100 微升 Hamilton 注射器进行。5 次单独注射,共注射 20 微升剂量,历经时间大约 2-3 分钟。在可见梗塞周围等距离进行 4 次注射,而第 5 次注射直接从梗塞区的中心点进行,中心点通过褪色区面积确定。注射后,对切口进行缝合,气胸发病率降低,动物脱离呼吸机并取掉插管。注射后 4 周(形成梗塞后 5 周),对动物进行再次麻醉,通过中线胸骨切开术使心脏暴露,并插入 Millar 导管。按照上文所述方法进行 dp/dt 值测定,随后通过放血法将该大鼠以安乐死方式处死。

[0505] 心脏功能测定结果(见图 13):治疗后 4 周,接受 ABM-SC 大鼠的测定结果表明,其 +dp/dt(最高血压正变化)值(A)显著升高。从 4 周 +dp/dt 值(“ Δ +dp/dt”)减去 0 周的值可知研究期间参与心脏功能的表达水平变化幅度,结果表明,虽然载体处理大鼠在整个研究过程中心脏功能降低(负 Δ 值),用任一种细胞群落治疗的动物心脏功能却表现出明显的改善(B)。

[0506] 与载体处理动物相比,接受 ABM-SC 的动物 tau 值(C)显著降低,提示左室顺应性增强。Tau 为等容性左室压衰减的时间常量。从 4 周的 -dp/dt 值(“ Δ dp/dt”)减去 0 周的 -dp/dt 值可知研究期间参与心脏功能的表达水平变化幅度,结果表明,虽然载体处理大鼠在整个研究过程中心脏功能降低(负 Δ 值),用任一种细胞群落治疗的动物心脏功能却表现出明显的改善(D)。[*p < 0.05, **p < 0.01 用 ANOVA 测定]

[0507] 心脏结构测定方法:通过用中线胸骨切开术给左前降支(LAD)冠脉周围放置永久性丝线结扎装置,Sprague-Dawley 雌雄大鼠接受了实验性心肌梗塞的模型诱导。对大鼠开始进行标准的环孢菌素 A 治疗(每天给药 10 毫克/千克 s.c.),该治疗程序贯穿研究的整个过程。

[0508] 在梗塞发生后的第 7-8 天,对大鼠进行麻醉,实施插管术,使肋间切口创面暴露于心尖。用一个配有 30 间距低死腔针的 100 微升 Hamilton 注射器将待测样品输入体内后,对心脏功能进行测定。5 次单独注射,共注射 20 微升剂量,历经时间大约 2-3 分钟。在可见

梗塞周围等距离进行 4 次注射,而第 5 次注射直接从梗塞区的中心点进行,中心点通过褪色区面积确定。注射后,对切口进行缝合,气胸发病率降低,动物脱离呼吸机并取掉插管。注射后 4 周(形成梗塞后 5 周),对动物进行再次麻醉,通过中线胸骨切开术使心脏暴露,并插入导管检测心脏。随后通过放血法将该大鼠以安乐死方式处死。首先用克他命(75 毫克/千克)和美托咪啶(0.5 毫克/千克)的混合物对大鼠进行深度麻醉。然后通过外科手术暴露胸腔,切下心脏,将其浸泡于 10%福尔马林中心缓冲液中固定。接着将心脏总共切成三块,放在填充模子中加工,然后进行石蜡填充。接着在 6 微米处将心脏组织切开,用苏木素-伊红(H&E)或马森三色染色剂染色。每个心脏至少有 6 个切片也同时用苏木精/酸性曙红和三色染色剂分别染色。具体而言,三色染色法可使胶原蛋白(蓝色)和肌肉组织(红色)通过显色加以区别。由于胶原蛋白指示结疤组织的存在(未发生再生),故确定了胶原蛋白与正常心脏肌肉的比率。并由此制定了半数打分数值,0 表示检测不到胶原蛋白,5 表示胶原蛋白量最大/严重。然后将染色的切片送给一位理事会注册专家进行组织形态学打分。

[0509] 每张片子包括三个心脏横切样品,显示两个心室中线(1)、心室距远轴端 1/3 处(2)和心尖(3)的横切面图。进行组织学分析时采用了下列分级体系:受损组织的位置:左心室(LV)、右心室(RV)、两室(BV)。

[0510] 受损心室的百分比(损伤尺寸):假设在百分比范围内(0-100%)实验性心室受损区的厚度得分:根据测量的毫米厚度定位 1-4 级。与已知的组织切片的标志性分界(例如,红细胞的平均直径为 7 微米,心肌组织的肌纤维束平均直径为 30 微米)。1 级(小于 0.5 毫米);2 级(0.5 毫米-1.0 毫米);3 级(1 毫米-1.5 毫米);4 级(大于 1.5 毫米)。

[0511] 心肌组织损伤区的心血管生长:0-4 级,从正常组织(0)到整个组织初始损伤区长满心血管(4)。

[0512] 血管初始损伤:已有血管的退化/坏死,血栓形成和/或由去除剩余血管残留导致的炎症,表示为 0-4 级,0 级表示无血管损伤,4 级表示整个涉及区都有血管损伤。

[0513] 组织损区内纤维化程度:表示为 0-4 级,从无纤维化(0)到由梗塞诱导手术引起的初始组织损伤的 20%发生纤维化作为定级水平(4)。例如,20%心室纤维化被定为(1)级,40%心室纤维化被定为(2)级,60%纤维化为(3)级,纤维化大于 60%的为(4)级。

[0514] 心脏结构观察结果:大鼠被处死后,心脏组织被制成切片并染色。一位理事会注册病理学专家进行半数打分(见图 15),评估心肌梗塞发生后 7 天接受载体或 ABM-SC 大鼠梗塞尺寸的变化情况。组织病理分析表明,与载体相比,接受 hABM-SC 的大鼠梗塞尺寸明显缩小。根据预设的刻度值,接受 hABM-SC 大鼠的组织学打分比载体对照的低大约两个点。图 14 显示了一个典型的梗塞尺寸减小的例子。组织病理分析结果表明, hABM-SC 降低纤维化发生,促进梗塞区的血管生成(见图 15),这与其再生活性一致。因而,结果观察到,用 hABM-SC 治疗的大鼠心脏组织结构发生极大的改善。请参见图 14 和图 15。

[0515] 例 10

[0516] 成人骨髓衍生体细胞抑制免疫应答

[0517] 试验 I:运用单向 MLR(混合淋巴细胞反应)试验分析丝裂原诱导 T 细胞增殖的抑制作用

[0518] 方法:将人体 ABM-SC 和 exABM-SC(分别为批号 #RECB801 和 RECB906)平铺在 75

平方厘米培养瓶中,浓度为 6000 个活细胞 / 平方厘米,培养瓶中含 15 毫升完全培养基,如附加 4mM L- 谷氨酰胺 (目录货号 #SH30034.01,批号 #134-7944,(美国犹他州 Logan 的 HYCLONE™ Laboratories 公司)) 的加强 DMEM(GIBCO™,目录货号 #12491-015,批号 #1216032(美国加州 Carlsbad 的 Invitrogen 公司)) 或者含 4mM L- 谷氨酰胺并附加胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 -A(ITS) (GIBCO™;目录货号 #51300-044,批号 #1349264) 的 HyQ® RPMI-1640(HYCLONE™ 目录货号 #SH30255.01,批号 #ARC25868),然后将其置于湿化三气培养箱 (4%氧气、5%二氧化碳,用氮气平衡) 中 37℃ 孵育。24 小时后,倒出用过的培养基,加入 15 毫升新鲜培养基。将人间质干细胞 (hMSC) (LonzaBioScience 公司,之前为 Cambrex Bioscience 公司,目录货号 #PT2501,批号 #6F3837) 平铺在 75 平方厘米培养瓶中,浓度为 6000 个活细胞 / 平方厘米,培养瓶中含 15 毫升 MSCGM™ (Lonza BioScience),然后将其置于湿化培养箱 (大气氧气和 5%二氧化碳) 中 37℃ 孵育。24 小时后,倒出用过的培养基,加入 15 毫升新鲜 MSCGM™ 培养基。培养 96 小时后收集上述 hABM-SC 与 hMSC 细胞。将收集的 hABM-SC 与 hMSC 细胞平铺在含 RPMI 完全培养基 (Hyclone) 的 96 孔圆底培养板中,浓度为 25,000 个活细胞 / 平方厘米。人外周血单核细胞 (PBMCs) 用 1.25uM CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) 标记后与 hMSC、RECB801、RECB906 一起或单独在 RPMI 完全培养基中培养,浓度为 250,000 个细胞 / 孔。刺激 T 细胞增殖时,接种的培养物浓度为 2.5-10 微克 / 毫升植物凝集素。72 小时后收集细胞并用 CD3-PC7 抗体 (Beckman Coulter) 按照每个厂商说明书进行染色,然后运用 FlowJo 软件在 FC500Cytometer 上进行计数分析。只取 CD3+ 细胞进行分裂指数分析。

[0519] 结果:单向 MLR 试验结果显示,同种异体人体 ABM-SC 和 exABM-SC 对丝裂原诱导 T 细胞增殖具有抑制作用。结果请参见图 16。

[0520] 试验 II:通过双向 MLR 攻击试验未检测到同种异体猪 ABM-SC 对 T 细胞介导的免疫应答的抑制作用。

[0521] 方法:在第 0 天 (治疗前) 收集猪的全血进行免疫试验,剖检动物后 (治疗后第 3 天或第 30 天) 进行细胞免疫应答分析。每只动物的 PBMC 均用 pABM-SC、丝裂原 ConA 或培养基进行培养。样品通过流式细胞仪进行分析,细胞增殖数用 FlowJo 软件计算得出。

[0522] 用 DPBS (Dulbecco's PBS) -2% 猪血清按 1 : 1 稀释全血样品。将稀释血液倒于 Ficoll 上 (Ficoll 与稀释血液的比例为 2 : 1),以 350xG 离心 30 分钟,用 0 刹停止离心。然后吸出上层溶液。中层溶液含需要的单核细胞,吸出后建立各样品的细胞库,并用 DPBS-2% 猪血清洗涤 3 次。洗涤后,将细胞团重悬于 20 毫升 ACK 裂解缓冲液中孵育 3 分钟,去掉残留的红细胞,然后以 250xG 离心 5 分钟。将细胞团用 20 毫升 DPBS-2% 猪血清洗涤后再重悬于 5 毫升 RPMI 完全培养基 (RPMI-1640,10% 猪血清,2mM L-glut,20mM HEPES,0.1mM NEAA,1X Penn-Strep) 中。离心后将细胞重悬于冷冻培养基 (猪血清中含 10% DMSO) 中,接着即刻加入 2 毫升冷冻瓶中置于低温冰箱冻存,细胞浓度为 20×10^6 个细胞 / 毫升。(温度降低速率 = -25℃ /min 直至 -40℃, +15℃ /min 直至 -12.0℃, -1℃ /min 直至 -40℃, -10℃ /min 直至 -120℃) 细胞用 2 毫升冷冻瓶分装后保存于液氮中。

[0523] 在第 0 天,将 pABM-SC 平铺于 96 孔培养碟中,以浓度 10,000 个细胞 / 孔在 AFG-104 培养基中按照每个测试条件的研究要求进行培养。培养板置于湿化培养箱在低氧 (4-5% 氧气、约 5% 二氧化碳,与氮气平衡) 条件下 37℃ 孵育过夜。

[0524] 第二天,用 CFSE(carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester) 标记 PBMC。简单的操作为,于 37℃ 水浴中融化几瓶 PBMC,用 10 毫升 RPMI 完全培养基洗涤,以 300xG 离心,然后重悬于 DPMS 中。将细胞浓度调至 10×10^6 个细胞 / 毫升,用终浓度为 0.625mM 的 CFSE 孵育 5 分钟。用 40 毫升冰浴 DPBS/5% 猪血清洗涤细胞,以 300xG 离心 10 分钟。再用 25 毫升 DPBS/5% 猪血清洗涤,然后离心,方法如前所述。用 10 毫升 RPMI 完全培养基第三次也是最后一次洗涤细胞。将细胞浓度调至终浓度 5×10^6 个细胞 / 毫升。根据下述研究要求将已标记的 PBMC 加入试验板中:吸出 AFG-104 培养基,加入 100 微升 RPMI 完全培养基。将 100 微升 RPMI 完全培养基加入非刺激孔中,向刺激孔中加入 100 微升培养基(含 20 微克 / 毫升的 ConA RPMI 完全培养基),载体孔中加入 4.5% 葡萄糖-RPMI 完全培养基。根据研究模板,96 个孔板中每个小孔接入 500,000 个标记的 PBMC。将培养板在 37℃、大气氧浓度(高氧)、5% 二氧化碳、无氮气、具有一定湿度的条件下培养 5 天。每个血样准备三份后即可达到所有条件。进行载体刺激的试验样品衍生于血样,但与培养基本身没有明显区别。培养 5 天后,收集细胞,将其从 96 个孔板转移至一个流式测试管中进行流式细胞仪分析。根据标准操作规程进行间接染色。所用一抗为生物素结合小鼠抗猪 CD3 单抗,在试验中将其暴露给链霉亲和素-PE-Cy7 二抗。细胞用 200 微升洗涤缓冲液重悬,然后在 Coulter FC500 上进行分析。

[0525] 结果:对于在基础水平和治疗后 3 天或 30 天收集的样品,计算其细胞分裂指数,随后用培养基、载体、pABM-SC 或 ConA 进行体外刺激试验。对于用 ConA 刺激的 CD3+ 细胞,在治疗第 3 天或第 30 天所有动物的平均分裂指数显著高于来自载体和处理前及剖检后经 pABM-SC 处理的动物的 CD3+ 细胞分裂指数(* $p < 0.05$)。请参见图 17。

[0526] 例 11

[0527] 临床应用开发

[0528] 已经进行了开放标签式剂量加强 I 期临床研究,旨在评价 hABM-SC 单个加强剂量的安全性,给药方式为心肌内注射,受试者为初次患急性心肌梗塞后 30-60 天的成年患者。本研究的首要目的在于考察 hABM-SC 单个加强剂量的安全性与可行性,运用 MYOSTAR™ 导管由 NOGA™ 或 NOGA XP™ 心脏电子机械作图系统导引,进行多次心肌内注射。次要目的在于考察 hABM-SC 单个加强剂量的初步疗效,疗效衡量指标为左室输出量、左心室内径、心肌梗塞尺寸和左心室电压。

[0529] 研究协议规定受试者需要接受 12 个月跟踪治疗,定期检测安全性。疗效的评定需要通过 90 天治疗和 6 个月随访进行。本研究的研究对象为 30-75 岁之间、同意参加研究的急性心肌梗塞(AMI)成年患者,在前 30 天内这些患者成功得到治疗,皮下血管再生恢复 TIMI II 级或高血流量,由心肌灌注成像(SPECT)测定的左心室射血分数大于或等于 30%。

[0530] 包含与排除标准:本研究的包含标准包括:(1) 30-75 岁(包含);(2) 自患 AMI 起 30-60 天(最新被确诊为 MI,导致心脏专一性肌钙蛋白 I(cTnI) 酶浓度相对于正常水平提高 1 倍,此外,ECG 变化与心肌灌注成像[SPECT] 确证的 MI 一致);(3) 皮下血管再生恢复 TIMI II 级或发生梗塞区域血流量高;(4) 育龄女性妊娠测试阴性(血清_hCG)(用药前 24 小时测试);(5) 心肌灌注成像(SPECT)测定的左心室射血分数(LVEF) 大于 30%;(6) 心脏酶(CPK, CPKMB, cTnI) 试验结果在正常基础范围内;(7) 必须能正常行走。

[0531] 本研究的排除标准包括:(1) 明显的冠状动脉狭窄,需要在 6 个月注册期内进行皮

下或外科血管生成术；(2) 左心室栓塞（活动或静止）；(3) 高级别房室传导阻滞（AVB）；(4) 患 AMI 后频繁复发持续（> 30 秒）或非持续性心悸（> 48 小时）；(5) 临床上明显的心电图正常，在心内作图及注射过程中可能干扰受试者安全性；(6) 心房纤维化伴随心率失常；(7) 重度心瓣膜病（例如，主动脉狭窄、二尖瓣狭窄、需要进行瓣膜置换的重度瓣膜功能不足）；(8) 有瓣膜置换史；(9) 自发性心肌病；(10) 重度外周血管病；(11) 肝脏酶（天冬氨酸氨基转移酶 [AST]/ 丙氨酸氨基转移酶 [ALT]）水平高于正常上限（ULN）3 倍以上；(12) 血清肌酐 > 2.0 毫克 / 分升；(13) 前三年内有癌症病史（基底细胞癌除外）；(14) 有骨髓移植史；(15) 已确认的人免疫缺陷病毒（HIV）感染；(16) X 光胸透（CXR）或血液培养可见并发性感染或败血症；(17) 注册前 30 天内参加一项实验性临床研究；(18) 注册前 6 个月内有酒精滥用或休养性药物滥用；(19) 注册前 14 天内做过大手术或有重大创伤；(20) 已确认的自身免疫病（例如，全身性红斑狼疮 [SLE]，多发性硬化症）；(21) 相对于实验室正常值，临床上凝血素（PT）或部分促凝血酶原激酶时间（PTT）水平升高；(22) 血小板减少症（血小板数 < 50,000/mm³）；(23) 未完全控制的 I 型或 II 型糖尿病，在前 3 个月的抗糖尿病治疗程序中发生异常或 HbA1c > 7.0%；(24) 未治愈高血压，舒张压（SBP）> 180mmHg 和 / 或舒张压（DBP）> 100mmHg；(25) 患 AMI 后 24 小时以上使用过特殊营养药物；(26) 其他伴随发生的情况如血液动力学改变、不稳定性心律失常及插管，首席研究员认为这些可能使受试者面临不适当的危险或可能干扰本研究目的实现；(27) 任何其他主要疾病，首席研究员认为这些疾病可能干扰受试者遵守协议、降低受试者安全性或影响研究结果的分析。以及，(28) 对照培养基注射的禁忌症（变态反应或肾功能损伤），研究时需要 CT 扫描。

[0532] 研究药物剂量与给药：研究药物剂量与给药：同一实验组中的受试者用药间隔时间为 3 天，后续组的用药大约间隔 4 周，其间复查上一组中所有受试者至少 3 周安全性数据。

[0533]	组别	剂量
[0534]	组 1	30 × 10 ⁶ 个细胞
[0535]	组 2	100 × 10 ⁶ 个细胞
[0536]	组 3	300 × 10 ⁶ 个细胞
[0537]	组 4	300 × 10 ⁶ 个细胞或 MTD

[0538] 用药当天，基础水平评估结束后，继用 NOGA™ 或 NOGA XP™ 电子机械作图系统（Biosense Webster, Diamond Bar, CA）进行经皮心室作图后通过经皮注射向心肌多次连续注射 hABM-SC。使用 MYOSTAR™ 导管用 LV 方法注射。

[0539] 研究过程：将对潜在受试者进行知情同意程序，并在计划 hABM-SC 给药之前 21 天内对受试者进行筛选，筛选程序必须在患 AMI 后 30-60 天内进行。确定受试者入选资格的筛选程序也将被用作基础水平值，除非医院 SOP 需要额外测试（即，插管前即刻进行测试）。用于评价疗效的基础水平测试将包括 6 分钟步行试验、NYHA 分类测试、B 型促尿钠排泄肽（BNP）浓度血样分析、心回波描记、左右心插管、心肌灌注成像（SPECT）和 NOGA™ 或 NOGA XP™ 电子机械作图。在批准加入研究的当天，将进行额外的基础水平血样测试（包括育龄女性的妊娠测试（血清 hCG）），还将进行资格验证。用药当天（研究第 0 天）受试者将进行 NOGA™ 或 NOGA XP™ 电子机械作图检查，还将给左心室置入 MYOSTAR™ 插管。hABM-SC 的剂量将通过多次连续注射向受损（由 NOGA™ 或 NOGA XP™ 确定）的心肌组织给药。hABM-SC

给药后,进行心回波描记检测可能的透壁穿孔,受试者将直接批准进入重症监护病房(ICU)进行24小时观察,伴随连续心脏遥感监测。无并发症的稳定受试者将由ICU转至次级看护病房(心脏监测),然后在用药后72小时回家。有并发症的受试者仍留在ICU,接受最好的医疗护理,直到病情稳定适合转至次级看护病房为止。安全性评价将在hABM-SC给药后6个月和12个月的第7、14、21、60和90天进行。疗效评价将在用药后6个月的90天进行,将包括分别由相差加强回波心描记术、心肌再灌注和活力分析(SPECT)、左右心插管(只用在第90天)、6分钟步行试验、NYHA分类和NOGA™或NOGA XP™电子机械作图(只用在第90天)测定的左心室输出量、左心室内径、心肌梗塞尺寸和左心室电压。本研究中安全性终点包括:(1)同研究协议中详细说明的不良事件;(2)临床上血液或学液组分包括CBC、CMP、CPK/CPK MB、cTnI、PT/PTT及HLA抗原分析相对于基础水平的显著变化;(3)ECG测定的心脏电生理活性在基础水平上的显著临床变化;(4)24小时Holter监测确定的心脏电生理活性在基础水平上的显著临床变化;(5)心回波描记(术后)确定的围手术期心肌穿孔;以及,(6)包括重点神经学检查在内的体检常规检查确定的身体与精神状态在基础水平上的显著临床变化。如果观察到体征和症状与脑血管病(中风)一致,将获得神经学咨询,做进一步评价。

[0540] 疗效终点:所述疗效终点包括:(1)与基础水平比较,通过心肌灌注成像测定的收缩末期和/或舒张末期心输出量(SPECT)变化;(2)与基础水平比较,通过心肌灌注成像(SPECT)测定的心肌梗塞尺寸变化;(3)与基础水平比较,通过相差加强2-D心回波描记技术测定收缩末期和/或舒张末期心室内径变化;(4)与基础水平和以往对照(中心实验室提供)比较,通过NOGA™或NOGA XP™电子机械作图测得的心肌hABM-SC注射区动作点位电压振幅变化;(5)与基础水平比较,由左右心插管确定的心输出量与心室压等级变化;(6)与基础水平比较,通过6分钟步行试验测定的生活质量变化;以及,(7)与基础水平比较,由医师所作的定期体检评定的功能性心血管病等级(NYHA功能分类方案)。

[0541] hABM-SC的心肌内给药:hABM-SC将通过直接导管导引注射从心室内向心肌给药。hABM-SC的心肌内给药将在NOGA™心脏导航系统(最先进的系统之一,体外完整心肌的物理、机械和电性质的三维成像系统,购自Biosense-Webster,Diamond Bar,CA)辅助下完成。实际注射时可用CordisMYOSTAR™/导管进行。NOGA™系统可进行左心室心脏功能的实时监测、心脏组织损伤的检测以及导管尖端的观察与放置。如果患者患AMI后心脏状况比较脆弱,一个相对无创性给药系统(与开放心脏或直接心内给药相比而言),即MYOSTAR™注射导管与NOGA™作图系统一起联用,被选作hABM-SC的给药系统。

[0542] 初步结果:已经获得了5位患者的初步结果。前3位患者组成原始剂量组(3000万个细胞),而最后两位患者接受第二次加强剂量(1亿个细胞)。总体上,hABM-SC对所有患者均具有良好的耐受性,几位患者的心脏功能均表现出改善的趋势。更详细的结果讨论见下文所述:

[0543] 安全性结果:患者中均未发现同种异体免疫应答反应(通过治疗前和治疗后抗体分析进行检测)。

[0544] 心脏功能评估:NOGA电子机械作图:功能作图在细胞治疗过程和治疗后90天进行。从第一个剂量组的第二位患者获得了具有代表性的单级电压图。在梗塞区可见一个清晰地电压缺失(数据未显示)。运用单级电压作为导引在梗塞的边缘进行15次细胞注射。

在随后的 90 天,可见一个清晰的单级电压的增强,正常电压几乎遍布整个梗塞区。第 1、3 和 4 位患者的电压改善程度相同(数据未显示)。

[0545] 心肌灌注成像(SPECT):在细胞治疗前、治疗后 90 天和 6 个月按照以前公开的方法进行灌注成像检查。所有图像均以数字信号捕获并进行分析。射血分数、灌注缺损尺寸和心室输出量均来自这项在基础水平和腺苷胁迫条件下进行的分析,分析同时伴随着 24 小时冲刷式重新扫描。对每位患者每个时间点的结果讨论如下:

[0546] 灌注缺损:一般来说,灌注缺损尺寸被认为可代表整体梗塞尺寸,其在患者治疗的随访期 6 个月内出现减小或未发生变化。患者的灌注缺损表现出减小可被理解为具有“临床显著性”,意为该缺损经过治疗被减至整个心室壁的 4-5% 以下。在这两种情况下,该改善区与用 NOGA 测定的电压改善区相对应。尽管有人认为可调查研究 NOGA,但该数据可说明假说的有效性,即单级电压可反映梗塞尺寸大小。

[0547] 射血分数(EF):一般而言,研究中患者的射血分数或者得到改善,或者相对无变化。某位患者的射血分数(EF)整体显著降低(6 个月期间由 63% 降至 50%),但是这位患者在细胞治疗期间出现了严重不良事件,致使产生这样的疑问,即实际应用中是否应该向心肌内输全细胞剂量。两位患者的 EF 表现升高,并且明显超出该患者组的预期值。由于无镇静剂对照,所以无法对该改善后的机制做出任何结论。

[0548] 舒张末期心室输出量(EDV):在治疗前和治疗后 90 天和 6 个月测定 EDV。一般来说,在随访期的 6 个月期间所有患者的 EDV 保持不变,提示这些患者未发生显著的组织重塑。

[0549] 图 18 通过比较基础测定水平与用 hABM-SC 治疗后 90 天获得的测定结果显示三位患者心脏固定灌注缺损范围的变化。图 19 通过比较基础测定水平(BL)与用 hABM-SC 治疗后 90 天获得的测定结果显示三位患者心脏射血分数的变化。

[0550] 例 12

[0551] 人体 ABM-SC 及其产生的复合物在体外产生红细胞中的应用

[0552] 众所周知,骨髓为环境提供促进并调节造血所需的必要物质条件,如基质分子、生长因子和细胞因子。(Dexter 等,1981)。如果不是所有,大多数已知可促进造血细胞自我更新和种系限制性分化的营养因子来源于间质支持细胞(Quesenberry 等,1985)。Roecklein 和 Torok-Storb(1995)指出,即使在一个相对较纯的这些细胞群落内,也可分离出在分化上促进造血的次级细胞群落。与以往文献中描述的非退化克隆不同,本文所述的 hABM-SC 指的是一个 CD45 阴性、CD90/CD49c 共表达的非造血支持细胞的纯菌落,可分泌许多诱导和维持红细胞生成作用的因子,其中包括但不局限于 IL-6(Ullrich 等,1989)、LIF(Cory 等,1991)、SDF-1(Hodohara 等,2000)、SCF(Dai 等,1991)、活化素-A(Shao 等,1992)、VEGF 和 IGF-II(Miharada 等,2006)(见图 20)。当由造血前体细胞(例如红细胞干细胞(ES)、造血干细胞、脐带血细胞(CBC)或定向成红细胞(BFU-E))起始产生血红细胞时,可利用人体 ABM-SC 和 / 或其产生的复合物,通过向成红细胞转运造血前体细胞补充、生长和分化所需的混合红细胞生成因子,诱导、增强和 / 或维持红细胞生成。结果请参见图 20。

[0553] 例 13

[0554] 细胞衍生复合物和营养因子的产生、分离、纯化及包装

[0555] 已经开发了一种两步法下游生物处理过程,用于生产、收集并纯化复合物,例如由

ABM-SC 和 exABM-SC 产生的生长因子、细胞因子、可溶性受体和其他大分子。由细胞按化学计量比例生产的这套分泌细胞复合物具有巨大的应用潜力,可用作再生性治疗因子前体、细胞培养试剂和 / 或体外研究细胞组织再生的工具。这类复合物还可用作细胞本身的替补物,促进初始红系祖细胞群落在悬浮培养物中的生长和种系特异性分化。

[0556] 无血清条件培养基的产生

[0557] 将冻存的人体 ABM-SC(批号 P25-T2S1F1-5)融化后用 1L 附加 4mM L- 谷氨酰胺(美国犹他州 Logan 的 HYCLONE Laboratories 公司目录货号 #SH30255.01)的加强 DMEM(GIBCO,目录货号 #12491-015,lot 284174(美国加利福尼亚 Carlsbad 的 Invitrogen 公司))。

[0558] 将细胞接种于一个 Corning® CellBind® 聚丙烯 CellSTACK® 小室(目录货号 3312(美国纽约 Corning 公司))中,使其密度为 20,000-25,000/平方厘米。该 CellSTACK® 十小室套组的一端安装有一个 CellSTACK® 培养小室填充辅助器(Corning® 目录货号 3333(美国纽约 Corning 公司)),而另一端装有 CellSTACK® 培养小室填充辅助器 37mm、0.1 μ M(Corning® 目录货号 3284(美国纽约 Corning 公司))。

[0559] 将培养物置于 37°C $\pm$ 1°C 培养箱中,充入血液混合气体(5 $\pm$ 0.25%二氧化碳、4 $\pm$ 0.25%氧气,平衡氮气(GTS, Allentown, PA))孵育 5 $\pm$ 0.5 小时。接种后 24 $\pm$ 2 小时后,去掉培养基,加入 1L 新鲜培养基,充气方法如前所述。大约 72 $\pm$ 2 小时后,在生物安全柜中以无菌方式从小室 CellSTACK® 套组取下无血清条件培养基,将其转移至 1LPETG 瓶中。随后将该无血清条件培养基通过切线液流过滤进行处理。

[0560] 无血清条件培养基的分离与纯化

[0561] 对一系列无血清条件培养基进行切线液流过滤(TFF),这些培养基按照上述步骤从 CellSTACK® 十小室套组制备。采用一种聚砜中空纤维(目录货号 M1ABS-360-01P(美国加利福尼亚 Rancho Dominguez 的 Spectrum Laboratories 公司)),其分子量分小于 100kD。这些无血清条件培养基(滞留物)通过与腔表面相切的中空纤维腔进行循环。分子量为 100kD 或更小的分子穿过腔进入一个 2LPETG 瓶中,这一部分物质称作渗出物或过滤物。该滞留物继续循环,直至体积降至大约不到 50 毫升为止。随后将其废弃,保留渗出物进行进一步处理。这样制成的渗出物(约 1L)为一种清澈的无血清溶液,含有小分子量分子,不含细胞残留物和大分子,本文将其表示为 Fraction#1。

[0562] 随后 Fraction#1 再次进行 TFF 处理,其中所用聚砜中空纤维材料(目录货号 M1ABS-360-01P(美国加利福尼亚 Rancho Dominguez 的 Spectrum Laboratories 公司))分子量小于 10kD。Fraction#1 随后被用作滞留物,通过与腔表面相切的中空纤维腔进行再循环。腔内可允许通过更小分子量($\leq$ 10kD)分子(即氨气、乳酸等)。该滞留物的体积降至 100 毫升后,对该溶液进行渗滤操作。将 1L 不含酚红的 α -MEM(HYCLONE,目录货号 RR11236.01(美国犹他州 Logan 的 HYCLONE Laboratories 公司))以相同速率加入滞留物循环池中,渗出物被抽出来,这样循环池中的溶液体积就会保持恒定。这样得到的滞留物只含小分子量分子,范围为 10kD-100kD,本文中表示为 Fraction#2。

[0563] Fraction#2 可通过再次 TFF 进行深层处理,此处 TFF 用的聚砜中空纤维(目录货号 M15S-360-01P(美国加利福尼亚 Rancho Dominguez 的 Spectrum Laboratories 公司))分子量小于 50kD。因此, Fraction#2 通过中空纤维的腔沿着与腔表面相切方向进行再次循

环。更小分子量 ($\leq 50\text{kD}$) 可透过腔。这两种处理液流均保留用作产品。这样得到的渗出物 / 过滤物基本上由 10kD – 50kD 分子组成 (Fraction#3), 而该滞留物则由大分子组成, 其分子量范围为 50kD – 100kD 。每种分流液用 60 毫升 PETG 瓶 (目录货号 2019-0060, Nalgene Nunc International Rochester NY) 冻存。

[0564] 这样分离的蛋白组分可继续进行进一步下游无菌加工处理及包装, 其中可对这些复合物进行透析、冻干及重建, 最终得到一个干燥的具有生物相容性的基质, 例如 LYOSPHERES™ (生产商为美国明尼苏达州 Hopkins 的 BIOLYPH™)。

[0565] 例 14

[0566] CD34+ 脐带血细胞 (CBC) 的分离、低温保存及扩增

[0567] 一种系定向性红系细胞 (CFU-E 或者网状细胞) 的大规模生产可采用下文所述方法由一个干细胞或成红细胞 (例如脐带血细胞, 红细胞干细胞, 造血干细胞, 或定向成红细胞 (BFU-E)) 前体细胞初始群落进行。

[0568] 用肝素化处理的血液收集袋收集来自健康新生儿各时期的脐带血。向脐带血中加入氯化铵裂解溶液, 然后以 $300\times g$ 于室温离心 15 分钟, 这样就制成了干净的核化细胞群落。从细胞团中吸出上清, 细胞团用含 5% 人血清白蛋白的 BSSD (洗涤液) 洗涤。将细胞以 $300\times g$ 室温再次离心 15 分钟, 洗涤液可通过吸出上清从细胞团中去除。根据已建立的操作规程用 MASC LS-columns (MACS®; 德国 Gladbach 的 Miltenyi Biotech 公司) 通过磁性细胞分选分离 CD34+ 细胞。然后用 CSM-55 重悬 CD34+CBC, 使其浓度大约为 2 万个细胞 / 毫升, 运用降温速率可控的冰箱低温保存。

[0569] BSSD (含 4.5% 葡萄糖平衡盐溶液) 按如下步骤配制:

[0570] 将 $450 \pm 0.5\text{g}$ 葡萄糖 (美国新泽西州 Gibbstown EMD LifeSciences 公司) 加到平衡盐溶液 (无菌刺激溶液) (BSS; 美国伊利诺州 Deerfield 的 Baxter) 中, 加入 QS 使其最终体积为 10.0L, 含 BSS。

[0571] CSM-55 (低温保存培养基, 含 5% DMSO、5% HSA) 配制步骤如下:

[0572] 在一个 2L 瓶中, 加有 1.4LBSSD、400 毫升 25% HSA (25% 人血清白蛋白溶液, 美国伊利诺伊州 ZLB Behring) 和 200 毫升 50% DMSO (50% 二甲基亚砜, 美国加州 Edwards Lifesciences Irvine)。

[0573] 洗液用 400 毫升 BSSD 加 100 毫升 25% HSA 配制而成。

[0574] CD34+CBC 在悬浮培养物中的扩增

[0575] 随后将细胞重悬于附加 1.0U/L 重组人 EPO (R&D Systems, Cat #287-TC) 的 StemSpan® H300 (StemCell Technology)、10LYOSPHERES™/L 中, 然后接种于可废弃的 HYCLONE™、灌注 BIOPROCESS CONTAINER™ (生物反应器) 或等同装置中, 使细胞浓度为 1.0×10^6 / 毫升。运用新鲜培养基的连续液流, 将培养物在 37°C 、5% 二氧化碳、4% 氧气并用氮气平衡的条件下保持 3 周。在第 14 天, 培养物中再补加糖皮质激素拮抗剂米非司酮, 可促进细胞核化过程, 如 Miharada 等 (2006) 所述。新鲜培养基的连续液流在这些条件下一直保持固定的速率, 直至第 21 天收集细胞。

[0576] CBC 在人体 ABM-SC 饲养层细胞上的扩增

[0577] 将低温保存的人体 ABM-SC 融化后重悬于附加 1.0U/L 重组人 EPO (R&D Systems, Cat#287-TC)、 4mM L-谷氨酰胺、10% 批次选择 γ -射线处理的牛胎血清 (Hyclone) 的加

强 RPMI Media 1640 (INVITROGEN™) 中, 再将细胞悬液以密度 10,000 细胞 / 平方厘米接种于 40 层细胞培养工厂 (Corning) 中, 并在 37℃、5% 二氧化碳、4% 氧气、37℃、用氮气平衡等条件下培养。第 5 天时, 倒出一半用过的培养基, 再加入一半新鲜培养基, 使其浓度为 1.0×10^6 CBC / 毫升。随后用新鲜培养基的不连续液流使培养基条件在新鲜 (on) 和附加条件 (off) 之间循环, 再回到新鲜培养基 (on)。在第 14 天, 培养物中再补加糖皮质激素拮抗剂米非司酮, 可促进细胞核化过程, 如上文所述。共培养物在这些条件下保持直至第 21 天收集细胞。

[0578] 例 15

[0579] ABM-SC 分泌清道夫受体与拮抗剂并以剂量依赖方式降低肿瘤坏死因子- α 水平

[0580] 背景介绍: 本发明的实例包括通过输送某些方法及复合物, 其用于有效治疗量的 exABM-SC 或者由其产生的复合物治疗、减少或预防受试者不利免疫应答反应 (例如炎症或自身免疫病) 发生。本发明的实例包括 exABM-SC 或者由其产生的复合物的利用, 故依赖于体外分泌复合物的天然合成或基础水平产生。此外, 本发明的实例还包括 exABM-SC 或者由其产生的复合物的利用, 即通过 exABM-SC 细胞操作调节 (上调或下调) 所产生的复合物的量及类型 (例如, 加入炎症因子前体如 TNF- α)。

[0581] 例如, 目前已经发现, exABM-SC 至少产生一种细胞因子肿瘤坏死因子 (TNF- α) 清道夫受体和至少一种白介素-1 受体 (IL-1R) 的拮抗剂, 以及至少一种白介素-18 (IL-18) 结合蛋白 (拮抗剂)。相应地, 本发明的实例包括某些方法与复合物应用、以及稳定细胞群落 (如 exABM-SC) 的使用及给药, 这些细胞可连续分泌用于治疗的野生型蛋白。

[0582] 本文所用的“稳定细胞群落”一词意为分离到的、体外培养的细胞群落, 当将其导入哺乳动物活体 (如小鼠、大鼠、人、狗、牛等) 中时, 已经分化成为一种细胞类型或其多种细胞类型 (如神经元、心肌细胞、骨细胞、肝细胞等等) 的代谢产物无法检测到, 细胞群落中的细胞继续分泌至少一种具治疗作用的复合物 (如膜可溶性 TNF- α 受体、IL-1R 拮抗剂、IL-18 拮抗剂、表 1A、1B 和 1C 中列出的复合物等等) 至可检测水平、或维持这种表达或诱导表达的能力。

[0583] 鉴于本发明的目的, “清道夫受体”专指任何一种可溶性或分泌受体 (无论是与膜结合或游离于胞外环境中), 可与其同源配体结合并中和该配体的作用。

[0584] 除了上述列出的炎症因子前体, 纵观本发明, 还需要理解一点, 即为了调节本发明的细胞群落产生的复合物的浓度和种类, 可用已知或后续发现或鉴定的因子处理, 这些因子可以是任意数量、任意种类、任意组合和 / 或任意浓度。例如, 本发明的细胞群落可能优先用下列因子处理: IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-23、TNF- α 、TNF- β 和瘦素。然而, 就可用于处理本发明细胞群落的不同复合物数量而言, 这一优先因子的简单列表既不属于专用, 也不用解释为有限使用, 且这些复合物也不局限于蛋白质, 还有其他许多种化合物亦可用于处理本发明的细胞群落 (包括, 简单的例子如其他生物大分子如核酸、脂类、碳水化合物等等, 小分子与化学物质如二甲基亚砷 (DMSO) 和一氧化氮 (NO) 等)。

[0585] 方法: 无血清条件培养基产品的生产方法如下文所述, 用于美联免疫吸附试验 (ELISA) (见下文)。将低温保存的 exABM-SC (批号 # MFG-05-15; 群落倍增约 43 次) 融化后重悬于附加 4mM L-谷氨酰胺、含或不含 10 纳克 / 毫升 TNF- α 的加强 DMEM (GIBCO™; 目录货号 #12491-015, 批号 # 1216032 (美国加利福尼亚 Carlsbad 的 Invitrogen 公司))。然

后将细胞悬液接种于 T-225 平方厘米 CELLBIND™ (美国纽约 Corning 公司) 培养瓶中 (培养表面用微波等离子体处理专利技术做过处理, 见美国专利号 6,617,152) ($n = 3$), 接种密度为 36 毫升培养基中 10,000、20,000、40,000 个细胞 / 平方厘米。以密度 40,000 个细胞 / 平方厘米接种的热灭活细胞用作阴性对照。通过将一部分细胞转至无菌试管中并在 70℃ 水浴加热器中 (有利于热传递) 孵育约 40 分钟, 细胞被热灭活。将培养物置于 37℃ 湿化三气培养箱 (4% 氧气、5% 二氧化碳, 用氮气平衡) 中孵育大约 24 小时。在同一天给培养度供给新鲜培养基去除未附着性残留细胞, 再放回培养箱。在第 3 天, 用 20 毫升 CENTRICON™ PLUS-20 离心过滤器 (美国马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公司) 按照每个厂商说明书对细胞培养基进行浓缩。简而言之, 浓缩剂以 1140xG 离心 45 分钟。将浓缩的上清液 (100x 终浓度) 转至干净的 2 毫升冷冻瓶中, 置于 -80° 保存备用。

[0586] 确定由人体 ABM-SC 在这些附着培养物中产生的特定分泌蛋白的水平, 在第 3 天, 对培养液进行 100x 浓缩, 按上文所述方法收集条件细胞培养物上清液, 然后再进行酶联免疫吸附试验 (ELISA)。试验当天, 将上清融化, 用前使其升温至室温。进行 ELISA 分析, 检测 TNF- α 、可溶性 TNF-RI (sTNF-RI), 可溶性 TNF-RII (sTNF-RII), IL-1 受体拮抗剂 (IL-1RA) 和 IL-2 受体 α (按照每个厂商说明书进行操作, 所有试剂盒均购自 R&D Systems 公司 (美国明尼苏达州 Minneapolis))。

[0587] 结果表明, 分泌的清道夫受体 (如 sTNF-RI) 和受体拮抗剂 (如 IL-1RA) 治疗相关水平由附着培养物产生, 可通过调节细胞浓度或剂量控制治疗相关水平 (见图 21-23)。重要的是, 这些数据还证明, 细胞对其生长的炎症环境条件发生应答。例如, 用高效炎症细胞因子 TNF- α 处理后, 细胞上调 sTNF-RII (见图 22B) 和 IL-1RA (见图 23) 的分泌水平。有趣的是, 在这些样品培养物中, TNF- α 水平随着细胞接种密度 (见图 21) 的每一次增加而显著降低, 提示 TNF- α 本身被 ABM-SC 或由其产生的因子通过某种方式隔绝。

[0588] 这就充分确立了一种认识, 即 sTNF-RI 和 sTNF-RII 均能结合 TNF- α 并中和其生物活性。由于两种 TNF 受体和 TNF- α 本身的可测定水平随着细胞接种密度的每一次增大而降低, 很可能是在本试验系统中 ABM-SC 衍生 sTNF-RI 和 sTNF-RII 均能结合到 TNF- α 上将并将其屏蔽。

[0589] 在测定的可溶性受体和受体拮抗剂中, 在只含热灭活细胞的培养物中未发现可检测水平。各试验条件之间的统计学比较分析通过单向 ANOVA 确定。

[0590] 例 16

[0591] 骨产生诱导试验: 当群落倍增大约 25 次以上的细胞群落暴露于标准骨诱导条件下或当落倍增大约 30 次以上的细胞群落暴露于加强骨诱导条件下时人体 ABM-SC 未表现出体外骨分化特性

[0592] 方法: 人 ABMSC 与 exABM-SC 按 3100 个细胞 / 平方厘米接种于 6 孔培养碟 (Corning, 目录货号 #3516), 每个孔中含 2.4 毫升附加 MSCGM™ SingleQuot Kit (Lonza, 目录货号 #PT-4105) 的间质干细胞基层培养基 (MSCBM™; Lonza, 目录货号 #PT-3238), 下文中将其称作间质干细胞生长培养基 (MSCGM™)。大约 4 小时后, MSCGM™ 发生改变, 达到合适的测试条件。阴性对照孔只加 MSCGM™ 或含附加 5 纳克 / 毫升重组小鼠 Noggin/Fc 嵌合体 (R&D Systems, 目录货号 #719-NG) 的 MSCGM™。测试孔用骨生成诱导培养基 (OIM; Lonza 目录货号 #PT-3924 和 #PT-4120) (标准骨诱导条件) 或附加 5 纳克 / 毫升重组小鼠 Noggin/Fc 嵌

合体的 OIM(加强骨诱导条件)处理。然后将培养物置于湿化二氧化碳培养箱中于 37℃ 培养,每 3-4 天添加新鲜培养基,持续 2 周。14 天后,按照厂商说明书用 Calcium Liquicolor kit(Stanbio,目录货号 #0150-250)处理培养物,进行钙测定。运用微孔板读取仪于 550nm 读取培养板的相应值。

[0593] 结果:在标准骨诱导条件(OIM)下或加强骨诱导条件(OIM和成形成素Noggin, OIM+Noggin)下培养来源于研究批次#MCB109的人体ABM-SC和exABM-SC。阴性对照培养物保持在生长培养基(MSCGM™)或附加Noggin的MSCGM™(MSCGM™+Noggin)中。

[0594] 当OIM培养基附加Noggin时,经过大约16次群落倍增的ABM-SC表现出钙沉积增加了大约6倍(即经过大约16次群落倍增的ABM-SC在OIM条件下钙沉积为约5微克/孔,在OIM+Noggin条件下钙沉积为约30微克/孔。在标准OIM条件下,ABM-SC在群落倍增约16次以上时就丧失了沉积可检测水平钙的能力,但是,通过补加Noggin则可逆转这种情况(即,群落倍增约25次的exABM-SC在OIM条件下沉积可检测水平的钙,而这些同样的细胞在OIM+Noggin条件下则可沉积约5微克钙/孔。相反,群落倍增30次以上时(如约35和43次群落倍增)exABM-SC在任一试验条件(标准或加强OIM)下均未见沉积可检测水平钙。

[0595] 例 17

[0596] ABM-SC 中 IL-1 受体拮抗剂(IL-1RA)和 IL-18 结合蛋白(IL-18BP)的表达

[0597] 方法:经历了大约43次群落倍增的人体ABM-SC(批号#P17-T2S1F1-5)融化后接种于附加3微克/毫升(1X)Brefeldin A的AFG生长培养基中,并置于湿化5%二氧化碳培养箱中37℃培养24小时。用猪胰蛋白酶从培养瓶解离培养的细胞,再按照每个CALTAG FIX & PERM®染色操作规程(CALTAGLABORATORIES;现属于Invitrogen公司(美国加利福尼亚Carlsbad))洗涤、并制备用于流式细胞仪分析的细胞悬液。用FITC结合小鼠抗人IL-1受体拮抗剂(IL-1RA;eBioscience,目录货号#11-7015,克隆CRM17)抗体或未标记兔抗IL-18结合蛋白(IL-18BP, Epitomics, 目录货号#1893-1, 克隆EP1088Y)1:10稀释液对细胞染色,两种染色均在室温下持续45分钟。FITC-兔-FITC标记羊抗兔抗体用于检测IL-18BP。

[0598] 同种型相配的对照用作阴性对照(Beckman Coulter)。

[0599] 结果:人exABM-SC表达基础水平的IL-1受体拮抗剂(IL-1RA,见图24A)和IL-18结合蛋白(IL-18BP,见图24B),即使在不含诸如TNF- α 等炎症信号的条件也会处于基础表达水平。

[0600] 例 18

[0601] 人体ABM-SC抑制TNF- α 和IL-13表达同时增强IL-2的表达

[0602] 方法:人体外周血单核细胞(PBMC)在含5%人体血清白蛋白、10mM HEPES、2mM 谷氨酸、0.05mM 2-巯基乙醇、100U/毫升青霉素和100微克/毫升链霉素的in RPMI-1640中共培养,培养用的24孔板小孔中含1)用丝裂霉素-C处理的同一供体PBMC(应答者+自身)或2)用丝裂霉素-C处理的不同供体PBMC(应答者+刺激者)。每一来源PBMC每次按 4×10^5 个细胞/孔接种。对于每个条件,培养物中附加或不附加人体ABM-SC,其接种密度为40,000个细胞/孔。将培养物置于湿化5%二氧化碳培养箱中37℃孵育7天,使该培养基变成条件培养基。收集条件培养物上清,运用SEARCHLIGHT™ 9-Plex试验(Pierce Protein Research Products,美国伊利诺伊州Rockford的Thermo FisherScientific公司)分析

检测各种细胞因子的存在。通过单向 ANOVA(差异分析)进行统计学分析。

[0603] 结果:同种异体 PBMC 的共培养(应答者+刺激者)导致 TNF- α 和 IL-13 水平升高,这与混合 PBMC 反应预期的结果一致。但是,当用人体 ABM-SC 刺激时,IL-13 和 TNF- α 水平均显著降低($P < 0.001$),提示通过炎症介导因子的病灶或血清水平,ABM-SC 可用于治疗慢性炎症性功能紊乱症或移植排斥反应。请参见图 25A、B 和 C。

[0604] 很明显,ABM-SC 在自体(应答者+自身)和同种异体(应答者+刺激者)混合 PBMC 培养中均诱导了 IL-2 的表达,使之水平升高($P < 0.001$),但同时抑制 PBMC 的增殖。假设 IL-2 在促进 T 细胞增殖中发挥重要作用,这一结果就显得有些矛盾,尽管如此,最近还是有研究显示,破坏小鼠 IL-2 信号转导途径引起淋巴结增生和自身免疫而非免疫缺陷,提示 IL-2 的主要生理功能可能是限制或调节而不是增强 T 细胞应答(Nelson,“IL-2、调节 T 细胞与耐受性”,*Jour. Immunol.* 172 :3983-3988(2004))。此外,现在研究表明,IL-2 还通过抑制体内 T 细胞应答促进自身免疫耐受的发生,这一机制可通过 CD4⁺/CD25⁺ 调节 T 细胞的增殖与成熟加以实现。由此可以推测,在治疗上,通过间接促进因诱导上调 IL-2 水平引起的 T 调节细胞成熟,ABM-SC 可用于诱导 T 细胞耐受。

[0605] 例 19

[0606] 人体 ABM-SC 抑制丝裂原诱导的外周血单核细胞增殖

[0607] 方法:成人骨髓衍生细胞(ABM-SC)在湿化培养箱(5%二氧化碳)体外培养 96 小时,然后转至 96 孔圆底培养板上,使细胞在 RPMI 完全培养基中的浓度为 25,000 个活细胞/毫升。人外周血单核细胞(PBMC)以 250,000 个细胞/毫升单独在 RPMI 完全培养基中培养,或与 ABM-SC Lots RECB801(继代培养至 19 次群落倍增)或 RECB906(继代培养至 43 次群落倍增)一起共培养。刺激 PBMC 增殖时,培养物接种于 2.5 微克/毫升植物凝集素(Sigma Chemical 公司)中。培养 56 小时后,进行细胞参入胸腺嘧啶(甲基-³H)(Perkin Elmer, 1microCi/well)分析。在 72 小时运用 Filtermaster 收集器将细胞收集到玻璃滤膜上。用 NXT TopCount Scintillation 计数器在 Omnifilter 镀金板中从滤膜读取细胞数。人间质干细胞被用作阳性对照。(人间质干细胞购自 Cambrex ResearchBioproducts 公司;现隶属于瑞士 Basel 的 Lonza 集团)。通过单向 ANOVA(差异分析)进行统计学分析。

[0608] 结果:当用其中一批 ABM-SC 刺激时,PBMC 诱导的细胞增殖作用显著减弱($P < 0.001$)。请参见图 26。间质干细胞(MSC)可用作阳性对照。这些数据提示,ABM-SC 不仅抑制丝裂原诱导的总 PBMC 增殖,而且在此试验系统中 ABM-SC 的存在并未诱导群落内的各种次级群落(如单核细胞、粒细胞、淋巴细胞)增殖。

[0609] 参考文献

[0610] Cory 等,“用 c-myc 逆转录病毒衍生的小鼠红系细胞系对白血病抑制因子、红细胞生成素和白介素-3 的应答,”*Cell Growth Differ.* 2(3):165-72(1991)。Dexter 等,“长期骨髓培养中红细胞生成的分子细胞生物学,”*Blood.* 58(4):699-707(1981)。

[0611] Dia 等,“人爆发形成单位-红系细胞需要直接与干细胞因子相互作用才能进行进一步发育,”*Blood.* 78(10):2493-7(1991)。

[0612] Hodohara 等,“基质细胞衍生因子-1(SDF-1)与促血小板生成素共同作用增强巨核细胞祖细胞(CFU-MK)的发育,”*Blood.* 95(3):769-75(2000)。

[0613] Miharada 等,“体外由造血干细胞和造血祖细胞分化的成红细胞的有效核

化,”Nature Biotech. 10 :1255-56 (2006)。

[0614] Müller-Ehmsen 等,“受损心脏的重建:患心肌梗塞并影响心脏功能后新生兔心肌移植细胞的长期移植,”Circulation. 105(14) :1720-6 (2002)。

[0615] Nelson,“IL-2、调节 T 细胞与免疫耐受,”Jour. Immunol. 172 :3983-3988 (2004)。

[0616] Quesenberry 等,“造血过程的调控研究,”Exp. Hematol. 13 :Suppl. 16 :43-8 (1985)。

[0617] Roecklein 与 Torok-Storb,“通过用人乳头瘤病毒 E6/E7 转导使个别人骨髓基质细胞系在功能上变为非退化型细胞,”Blood. 85(4) :997-1005 (1995)。Shao 等,“活化素-A 对纯化的人红系祖细胞球蛋白表达的影响,”Blood. 2 月 ;79(3) :773-81 (1992)。

[0618] Ullrich 等,“重组白介素-6 对体内造血和 RBC 与 WBC 循环数量的影响,”Blood. 73(1) :108-10 (1989)。

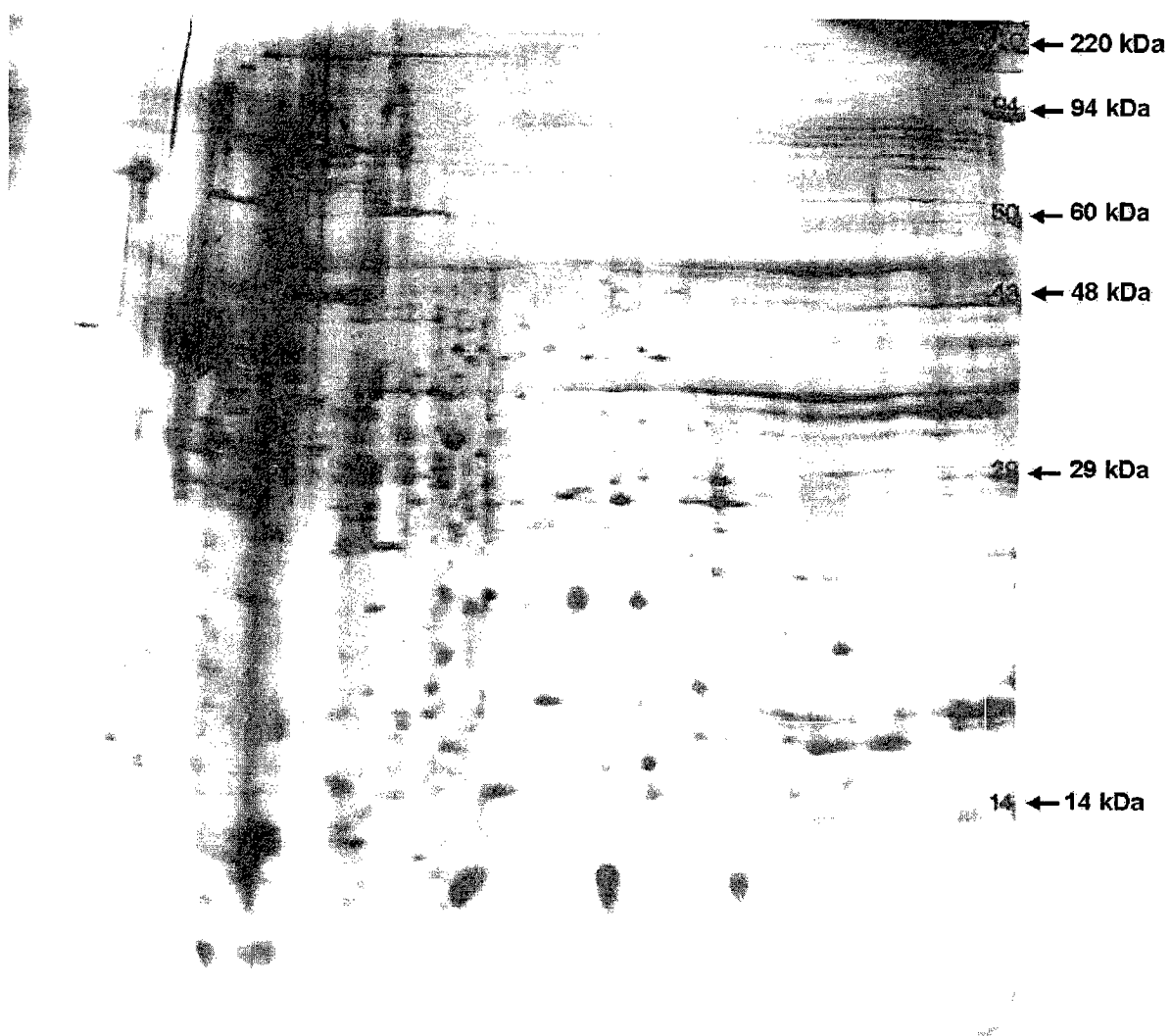


图 1

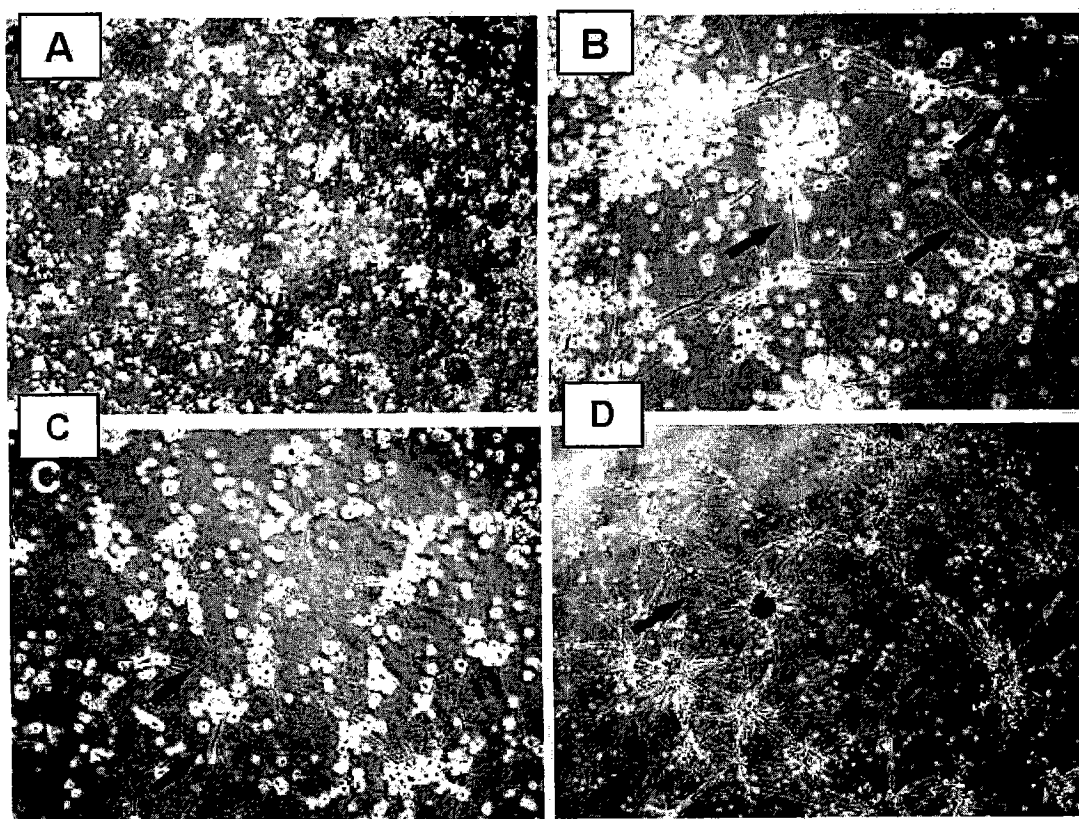


图 2

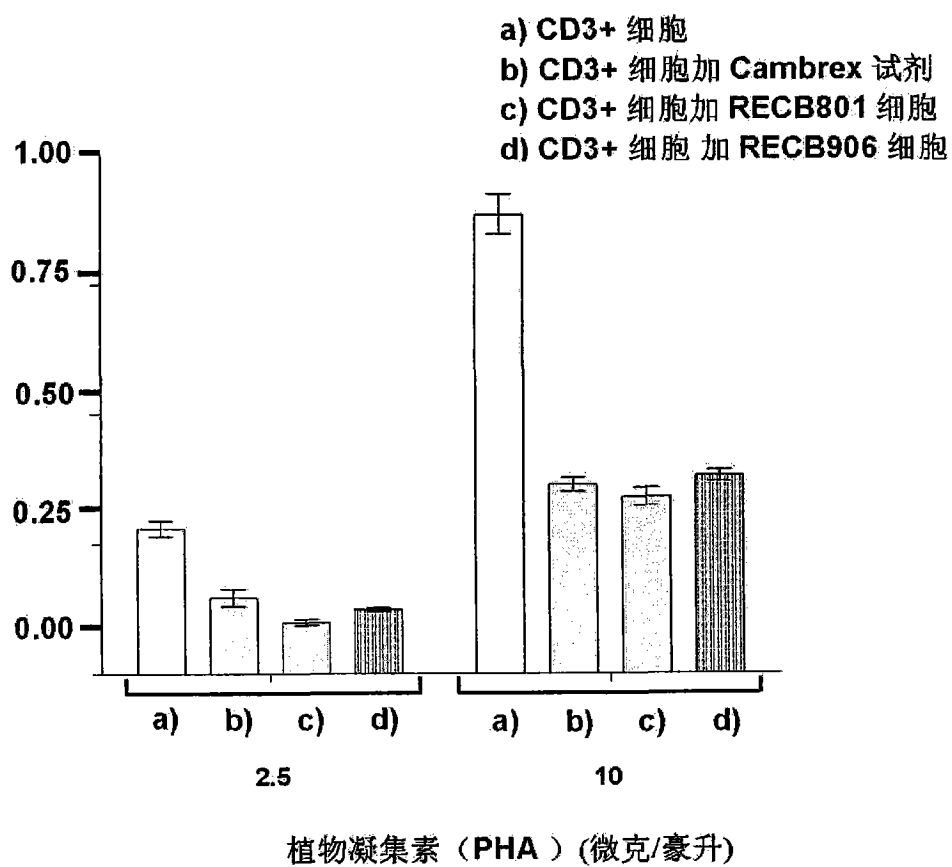


图 3

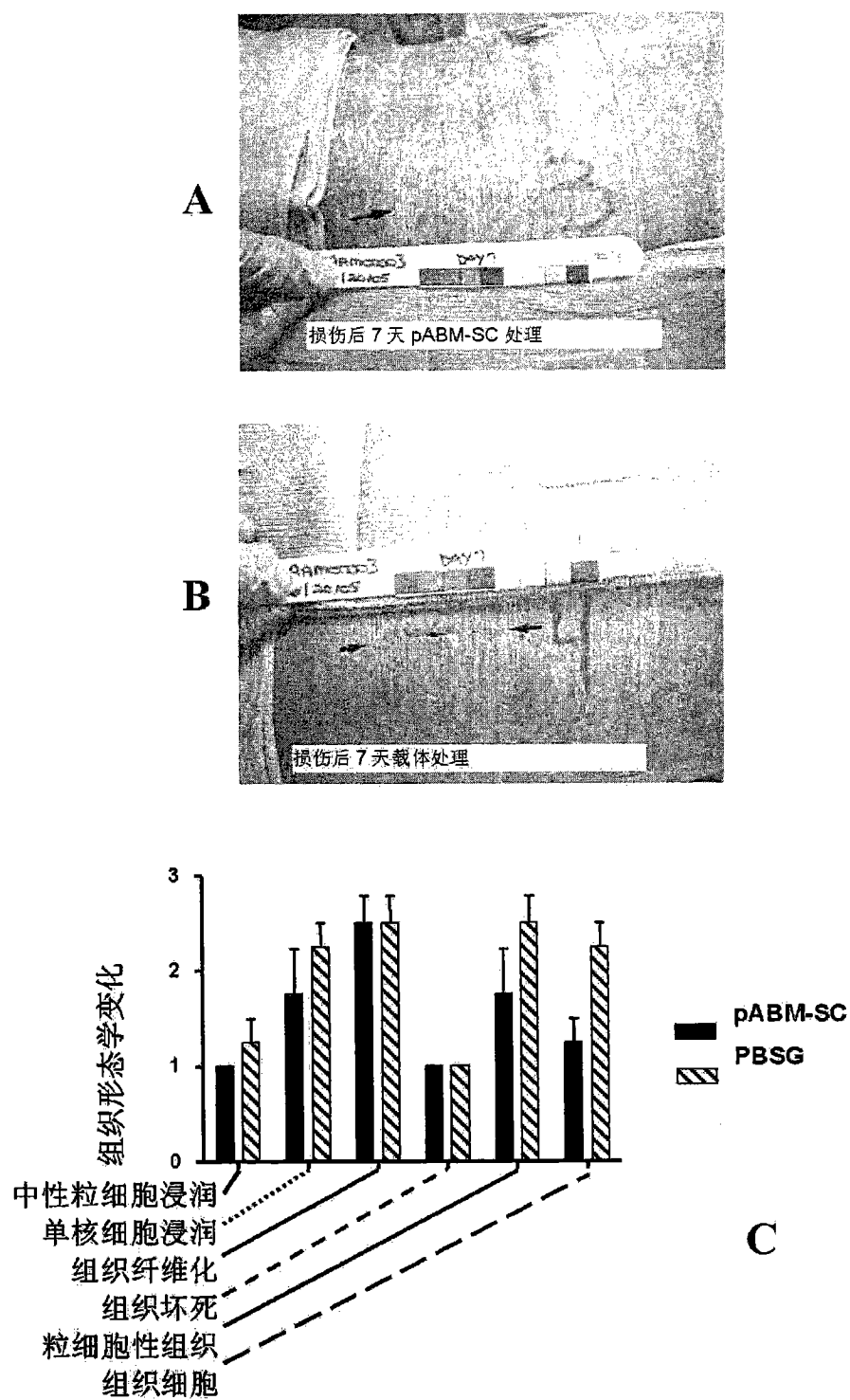


图 4

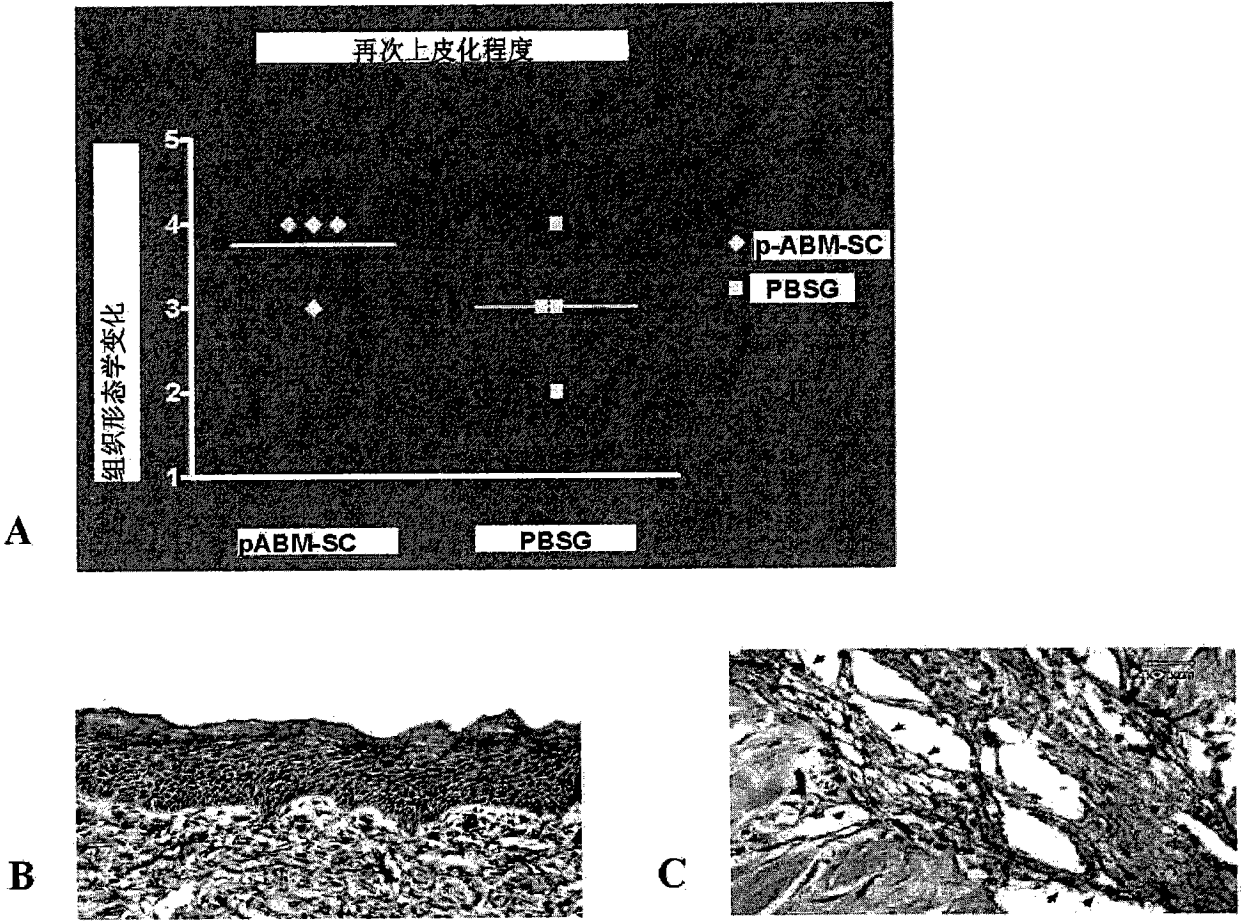


图 5

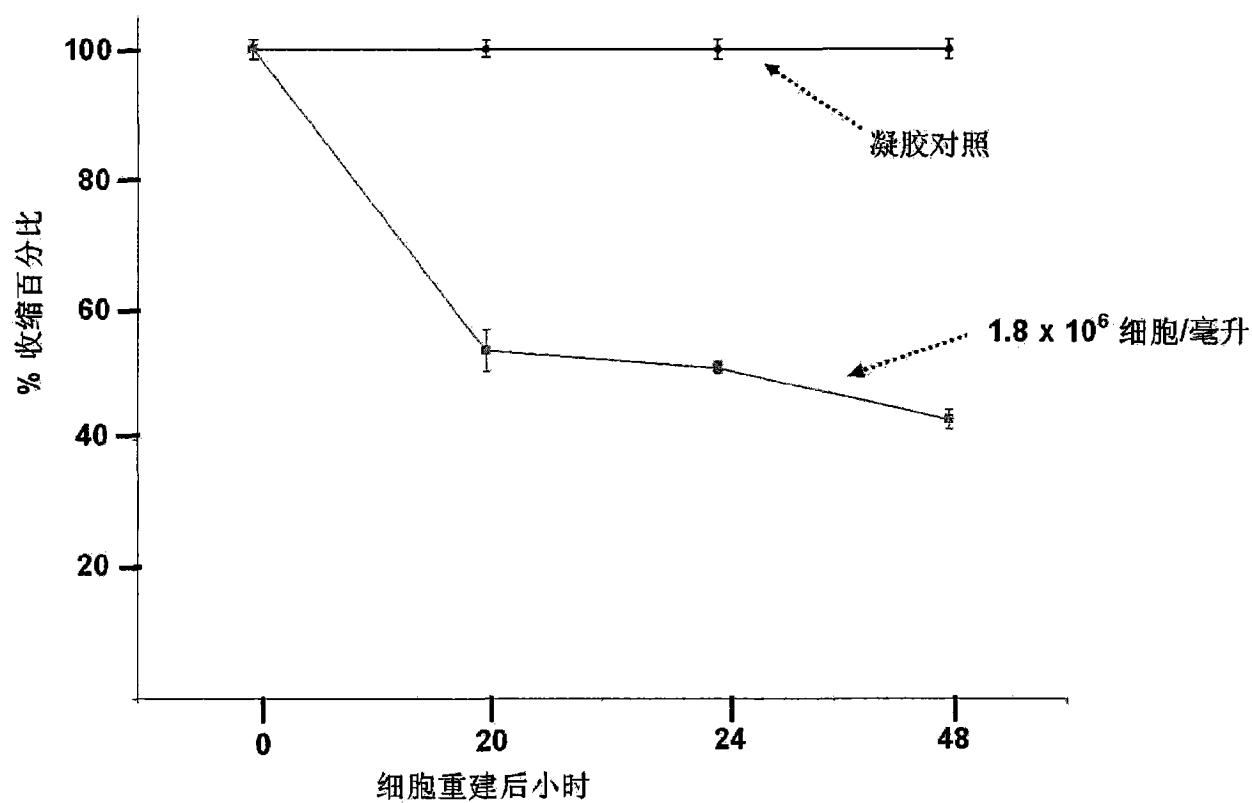


图 6

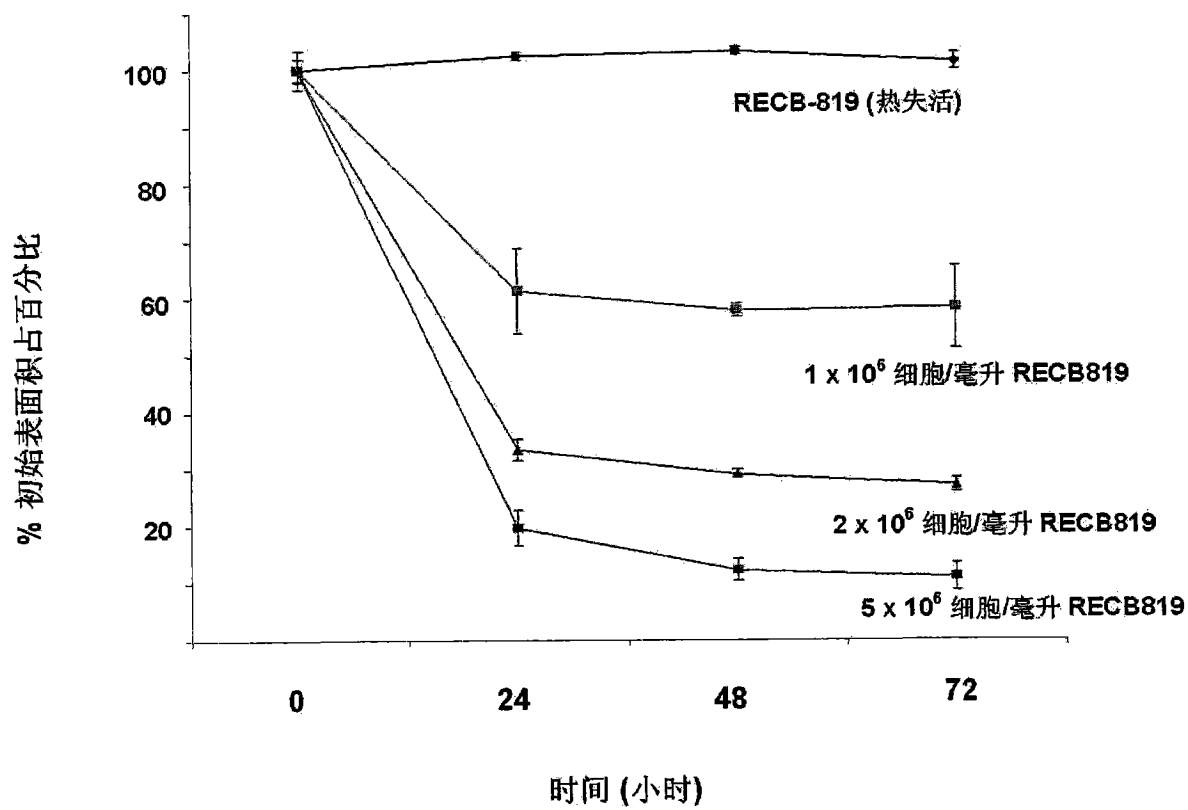


图 7

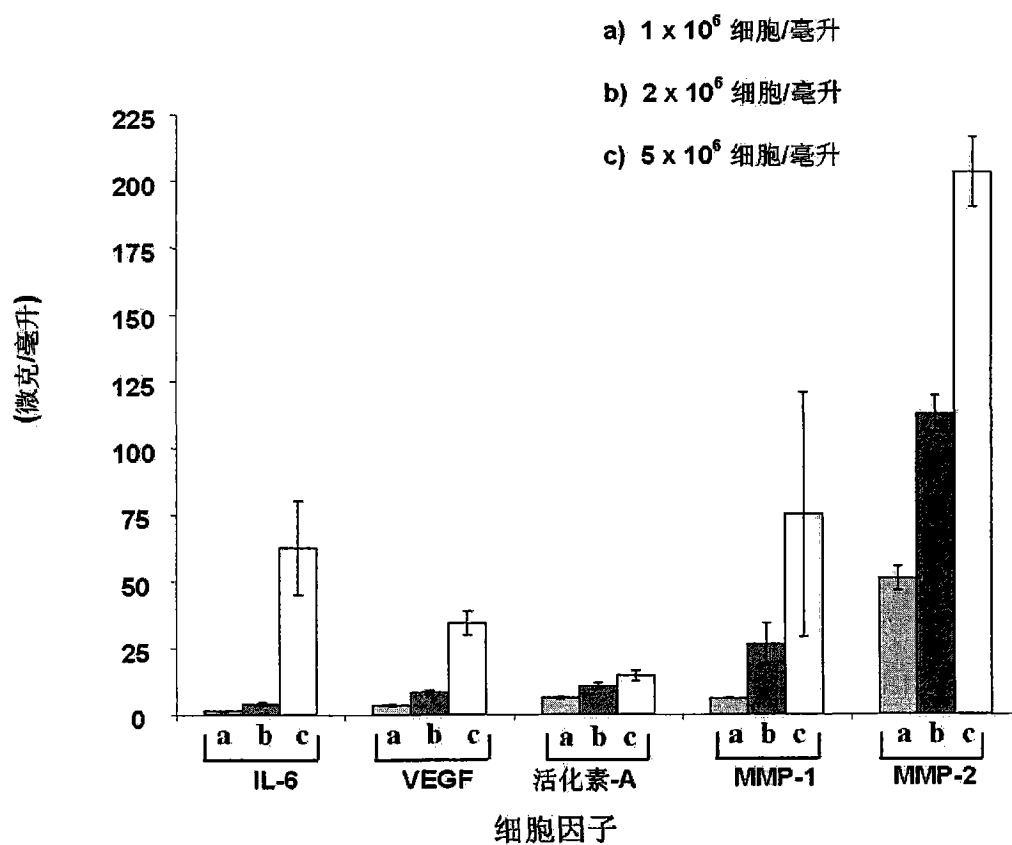


图 8

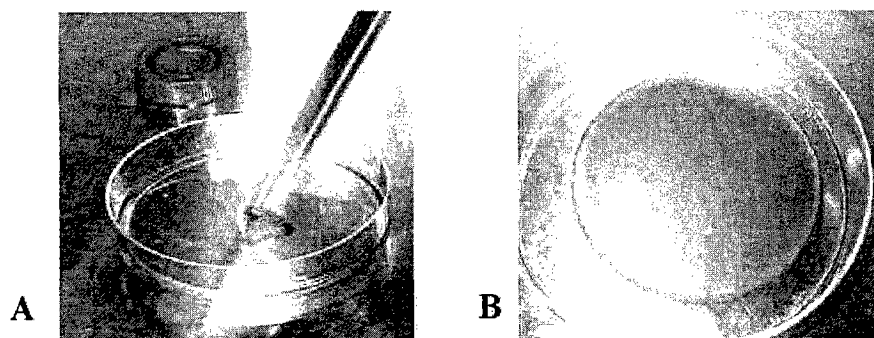


图 9

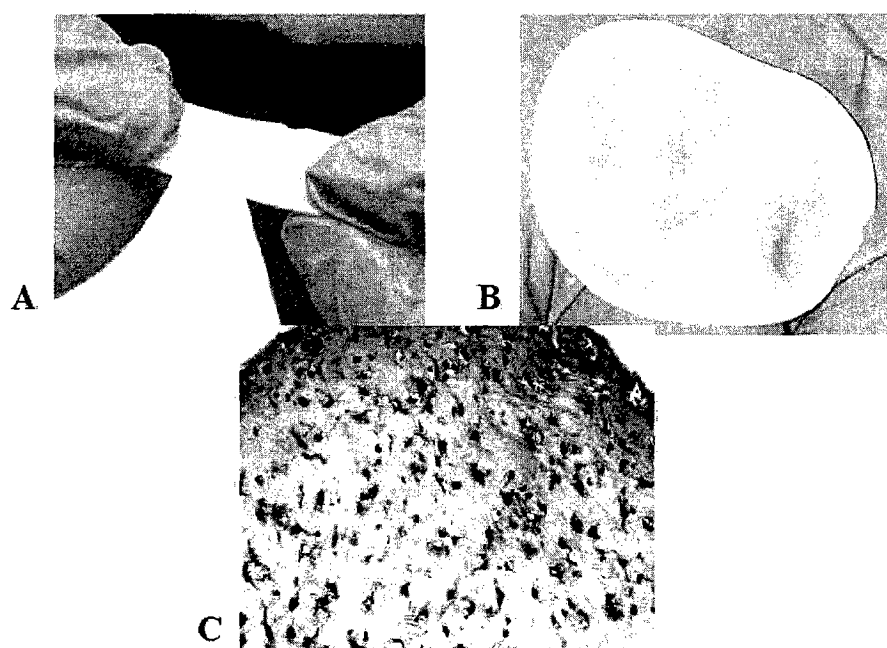


图 10

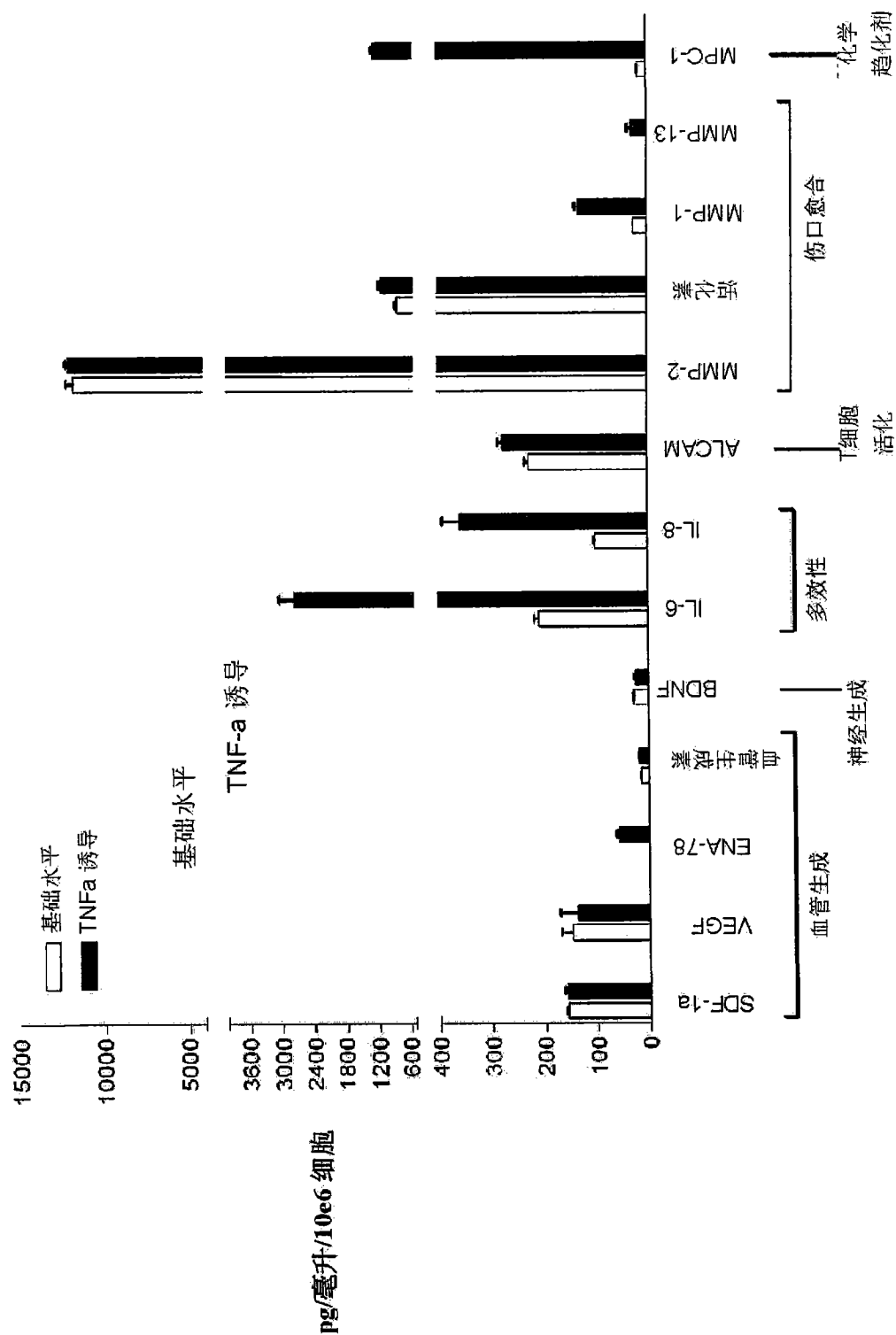


图 11

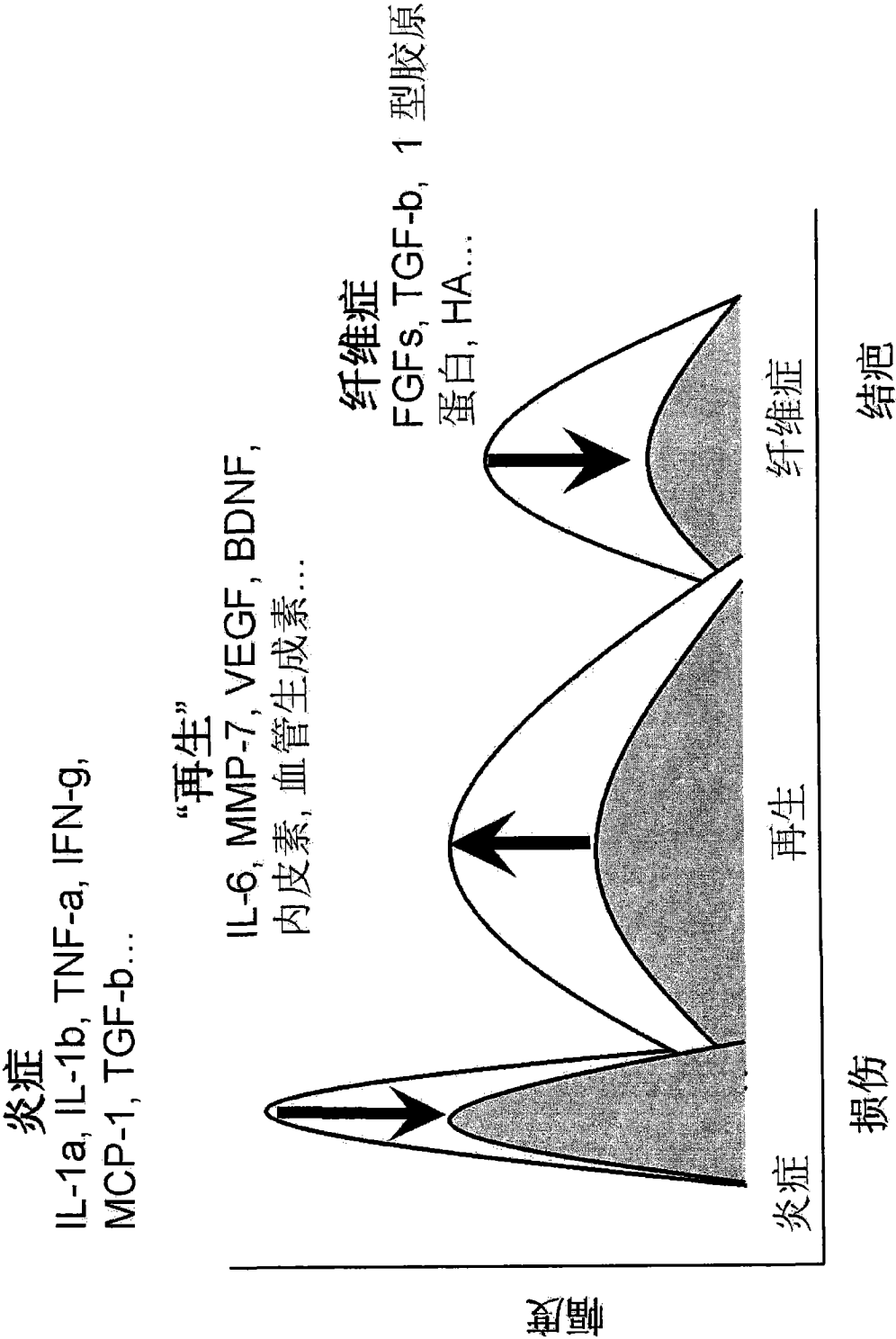


图 12

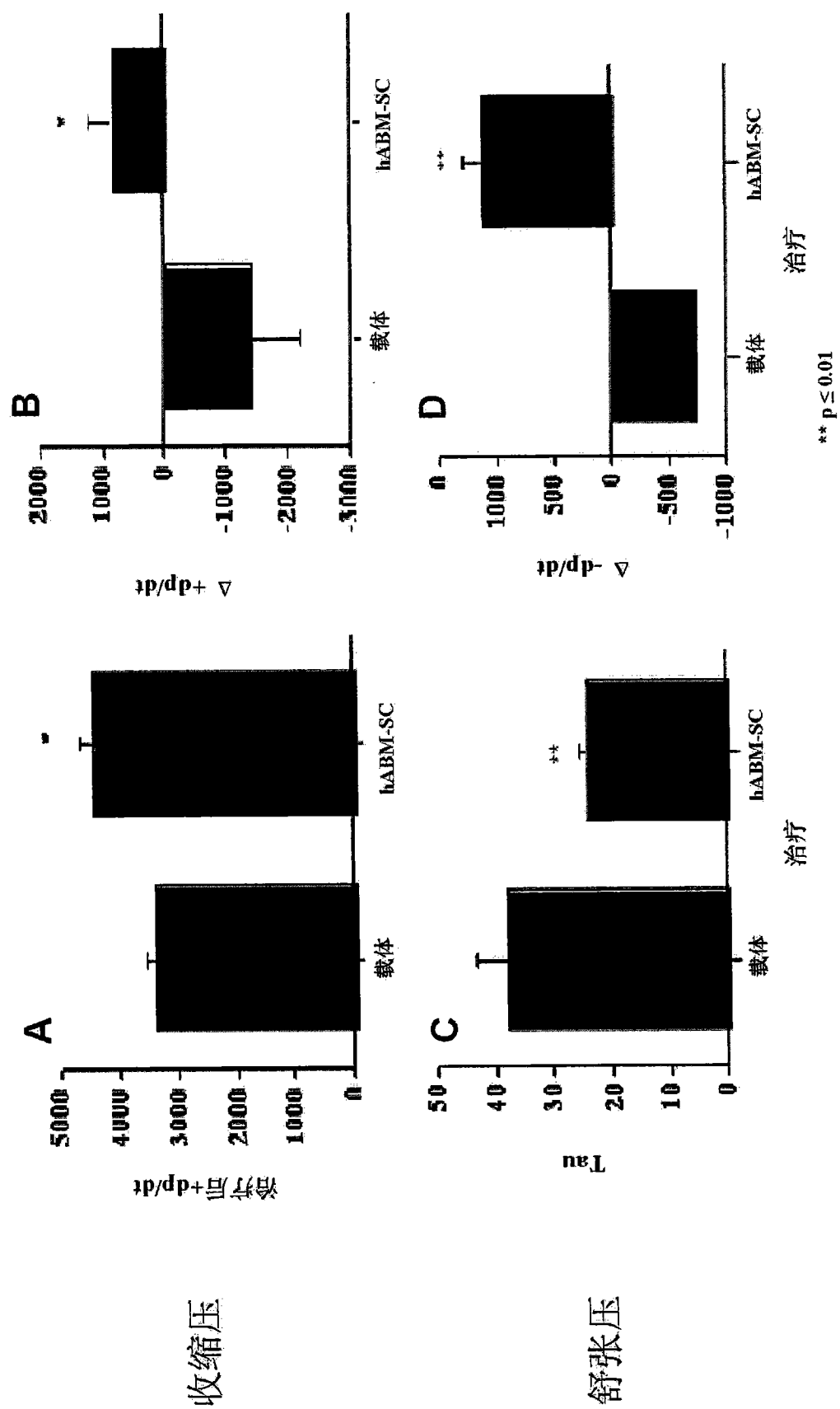


图 13

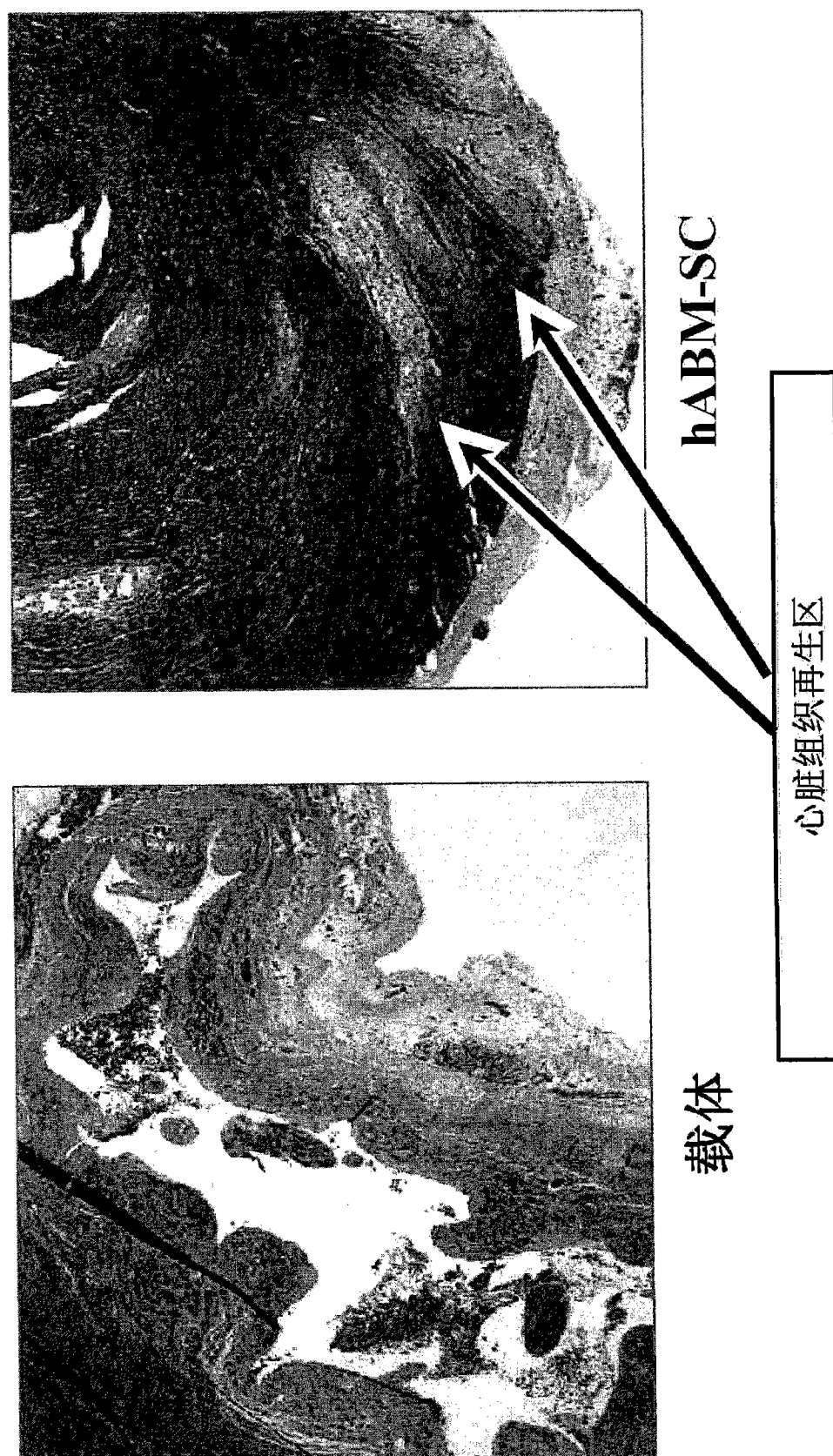


图 14

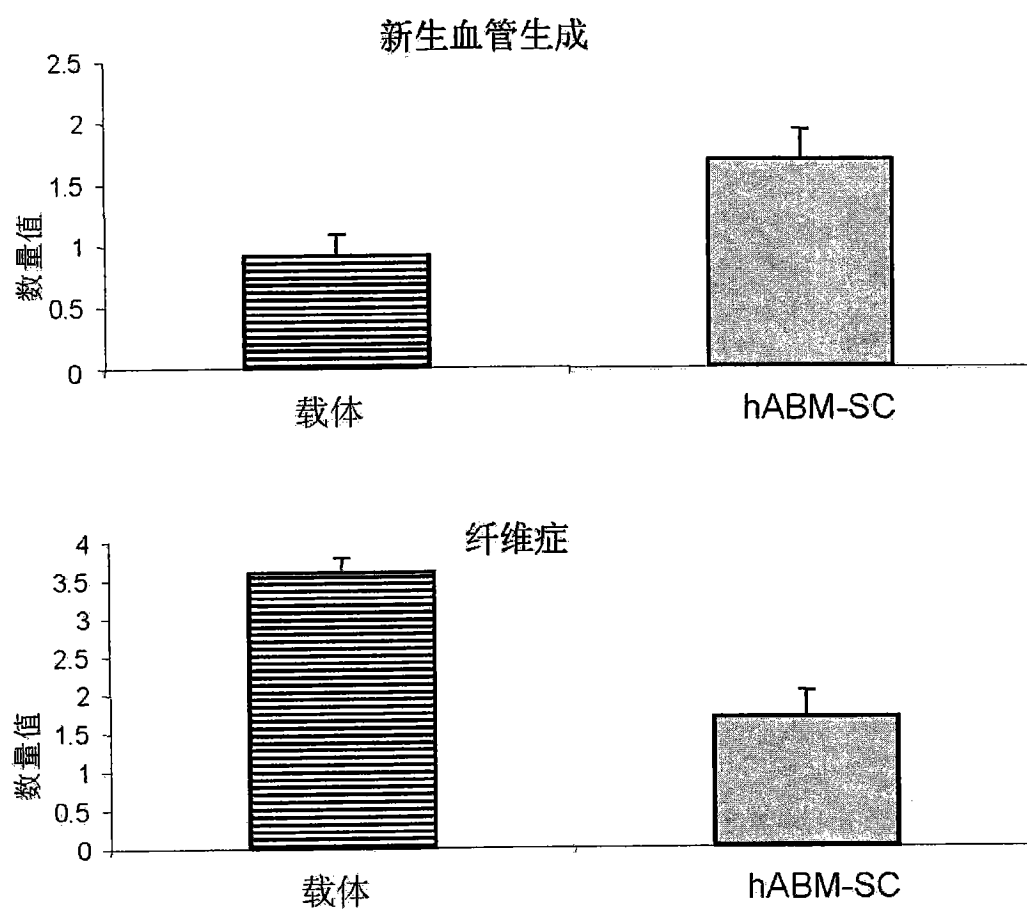


图 15

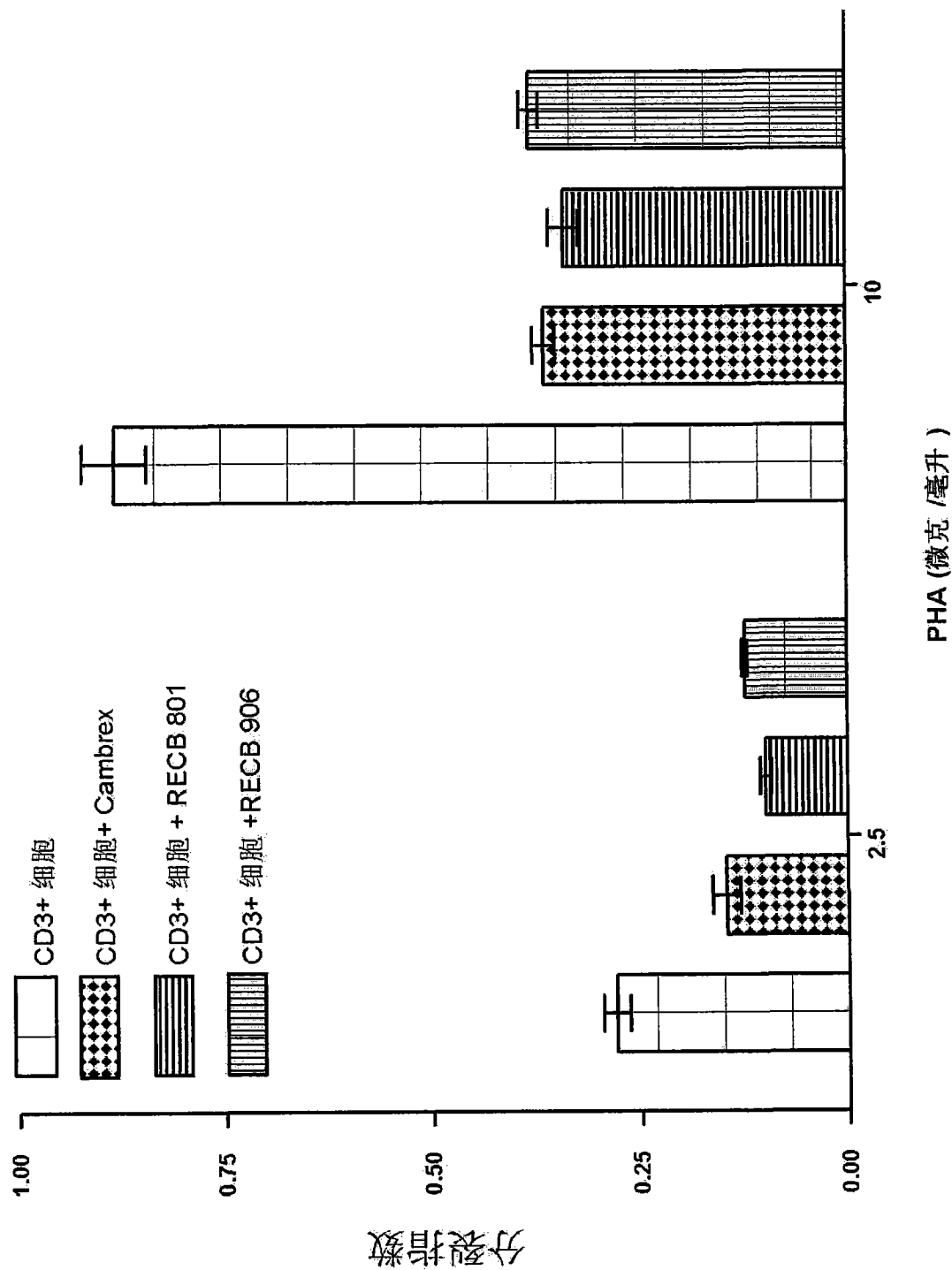


图 16

+Δ猪同种异体 CD3+ 淋巴细胞在双向混合淋巴细胞培养中的分裂指数

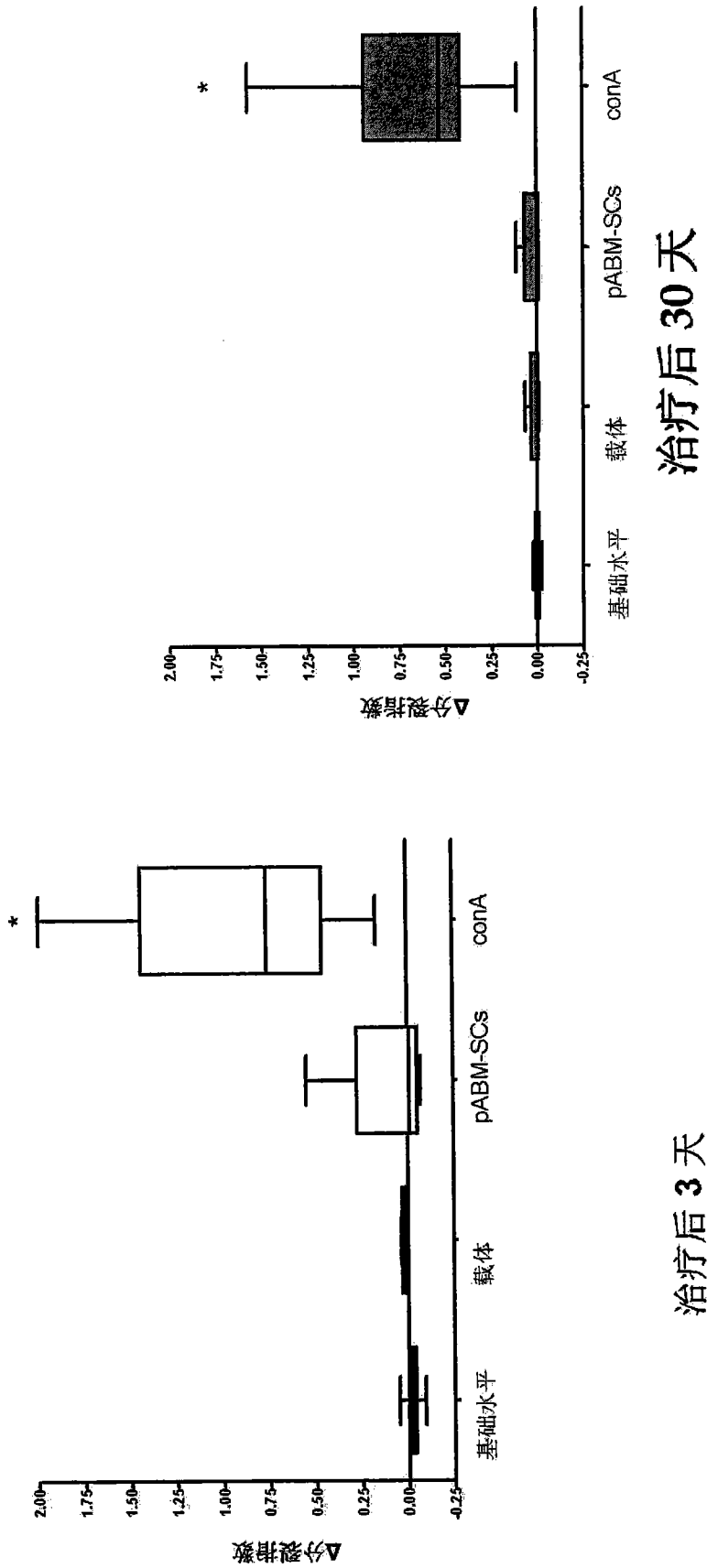


图 17

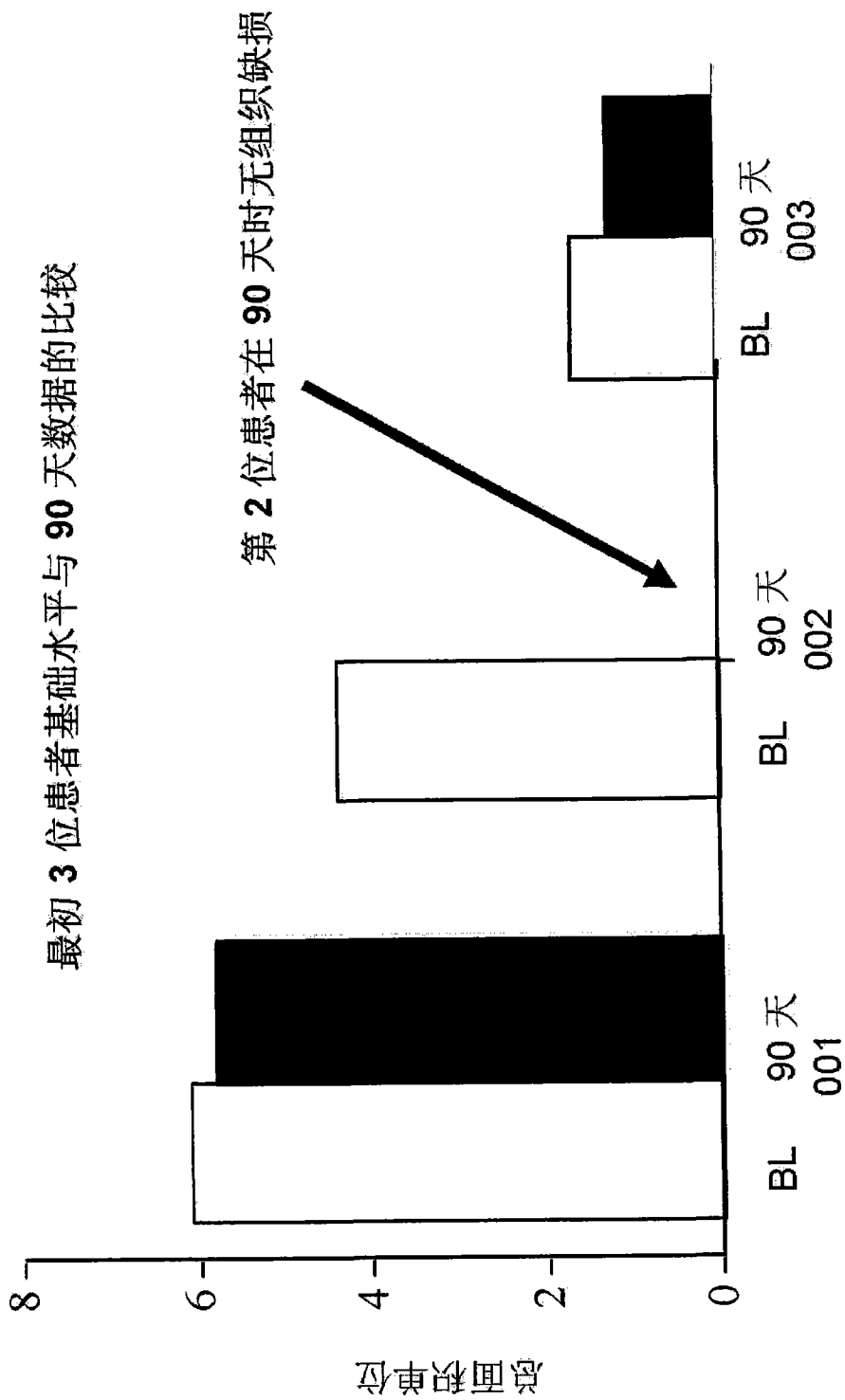


图 18

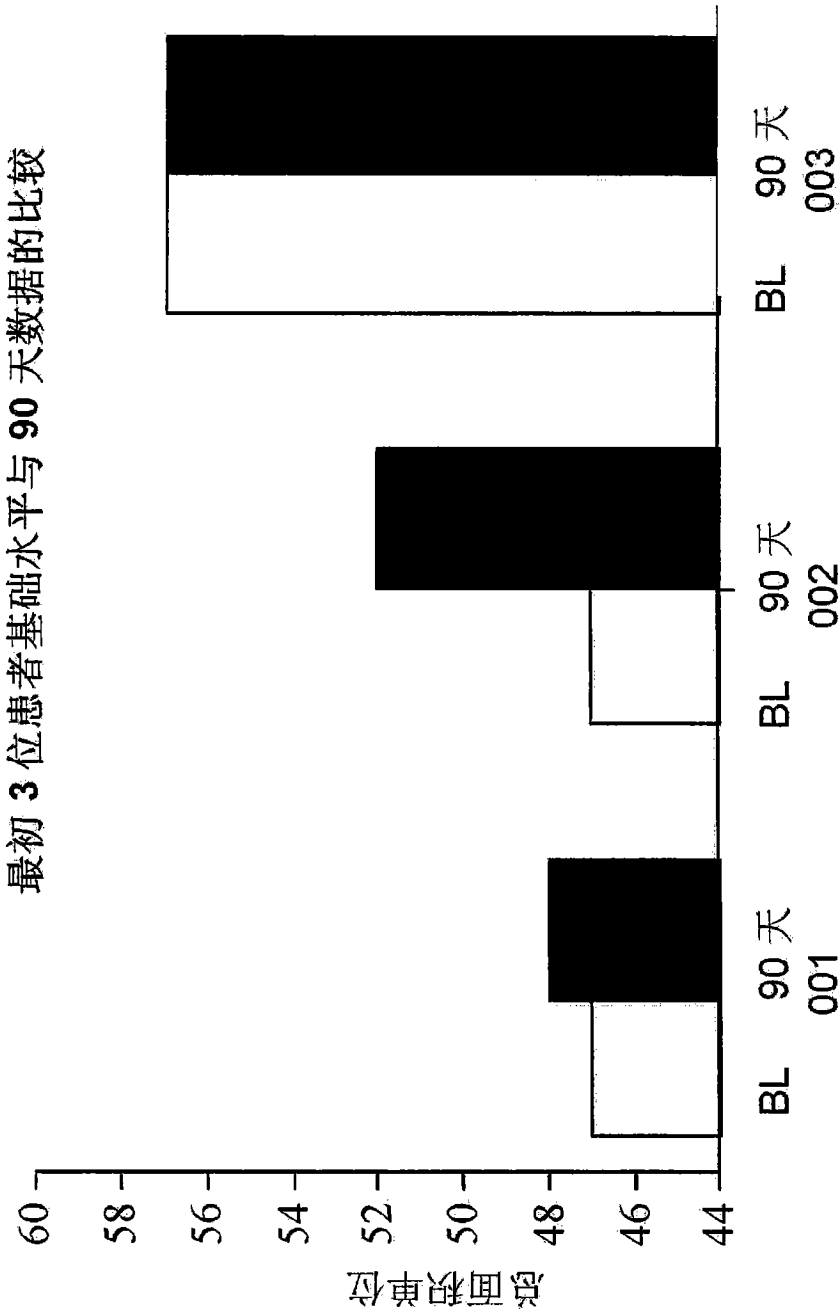


图 19

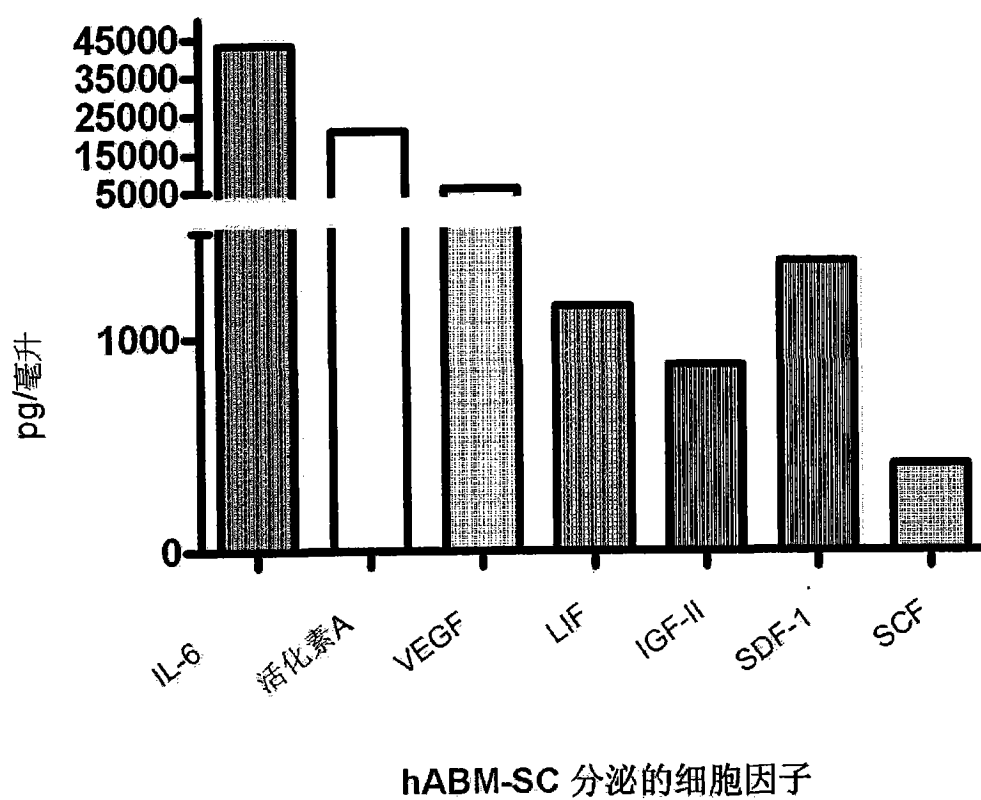


图 20

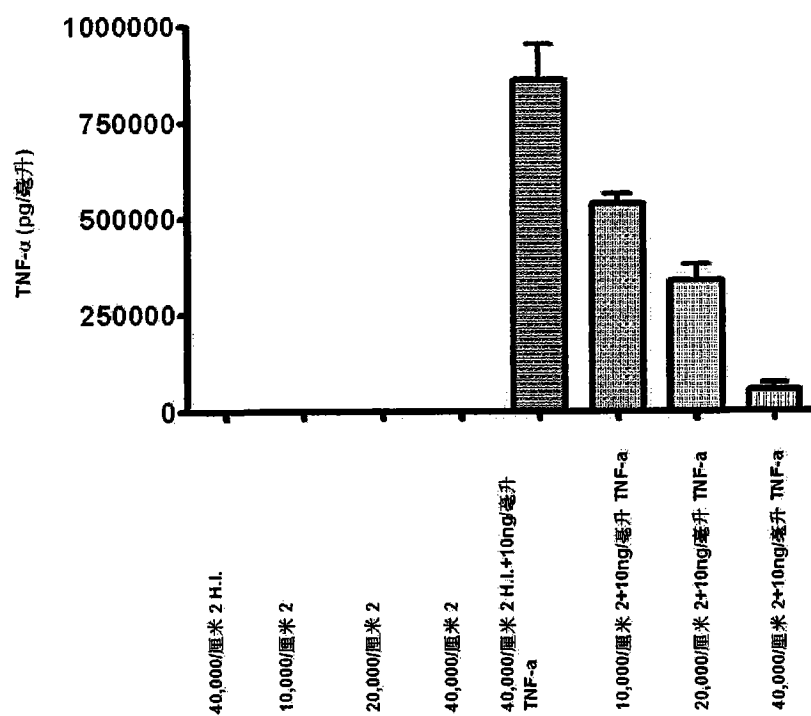


图 21

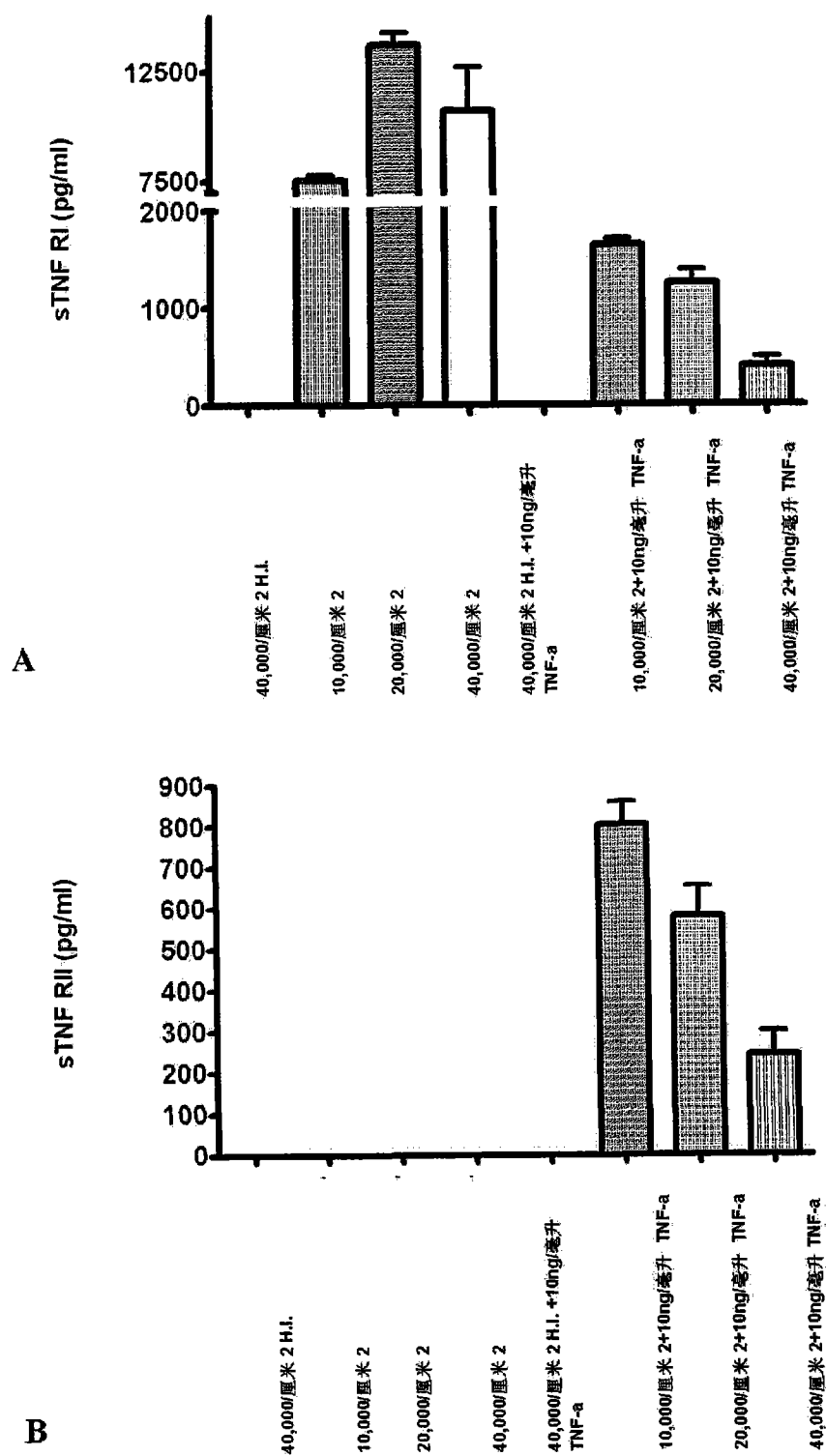


图 22

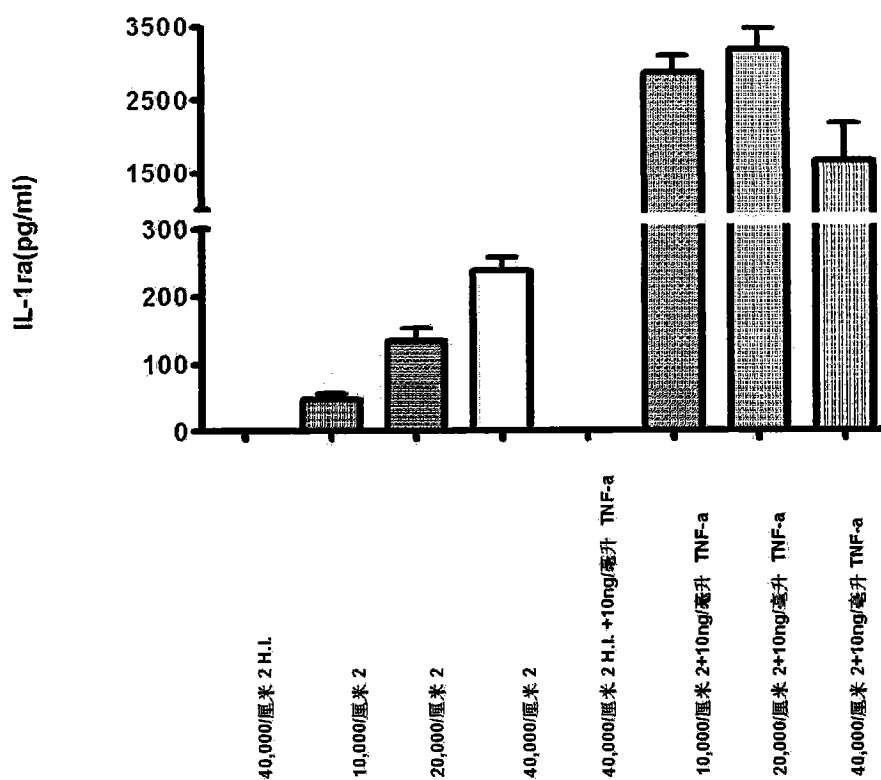


图 23

IL-1RA

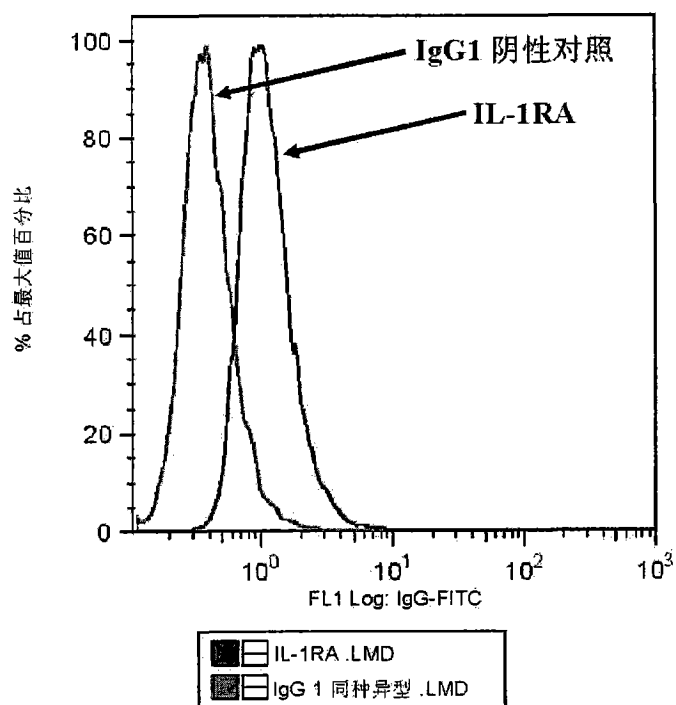


图 24A.

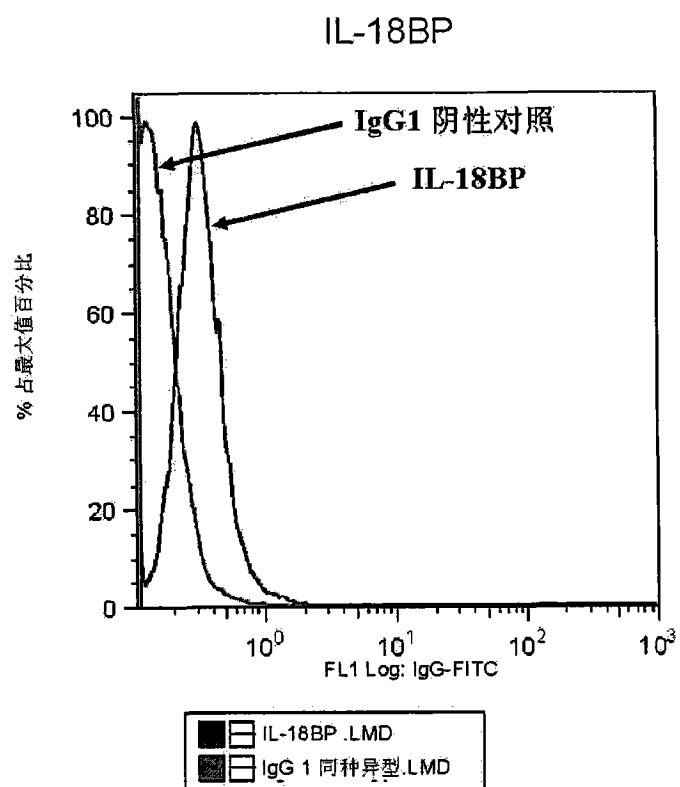


图 24B.

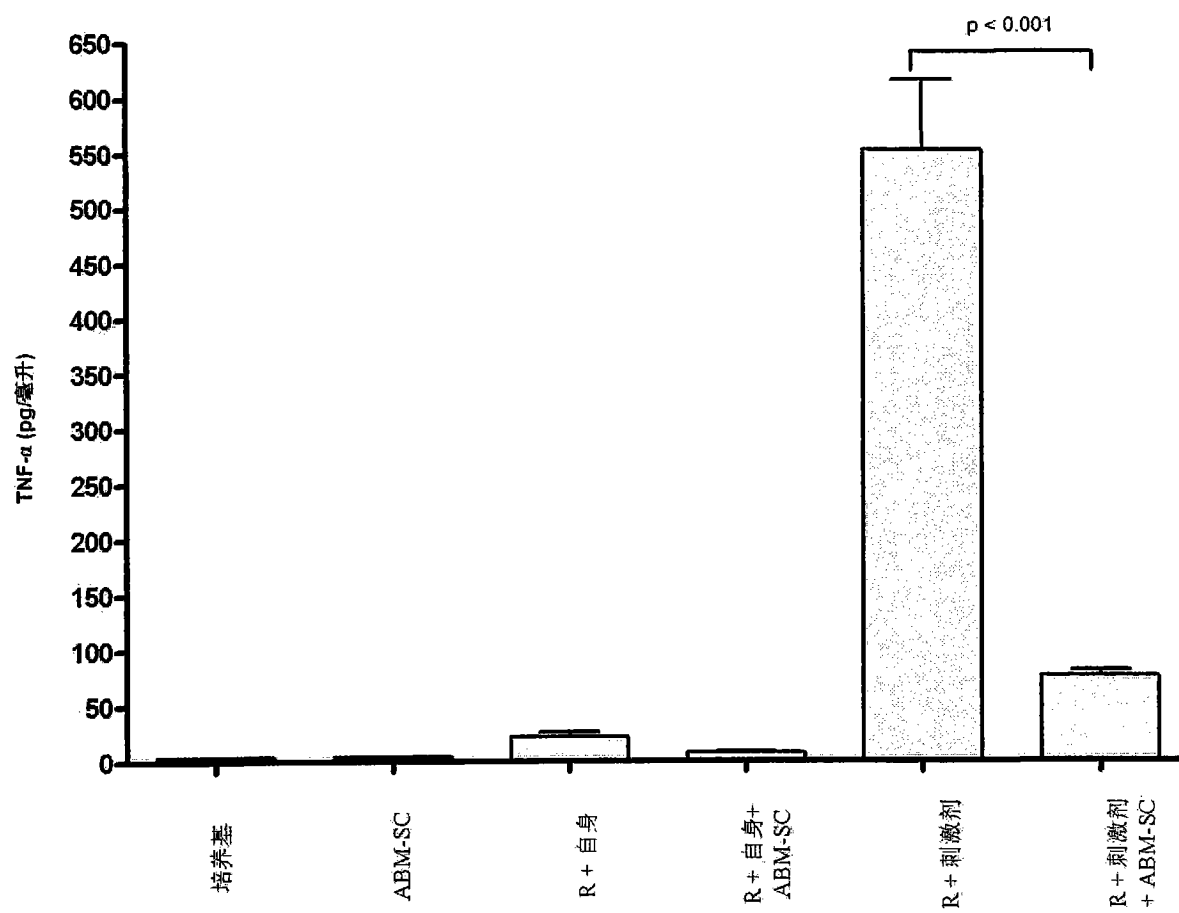


图 25A

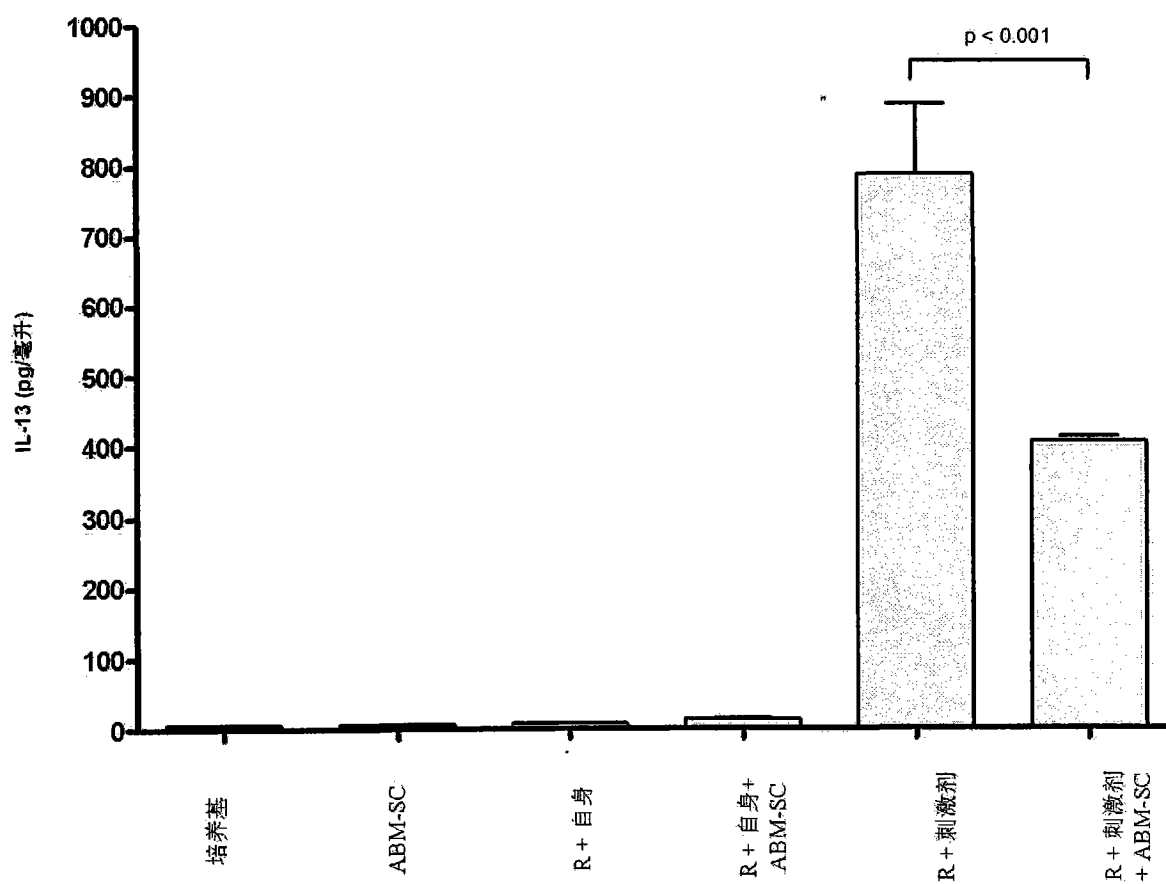


图 25B

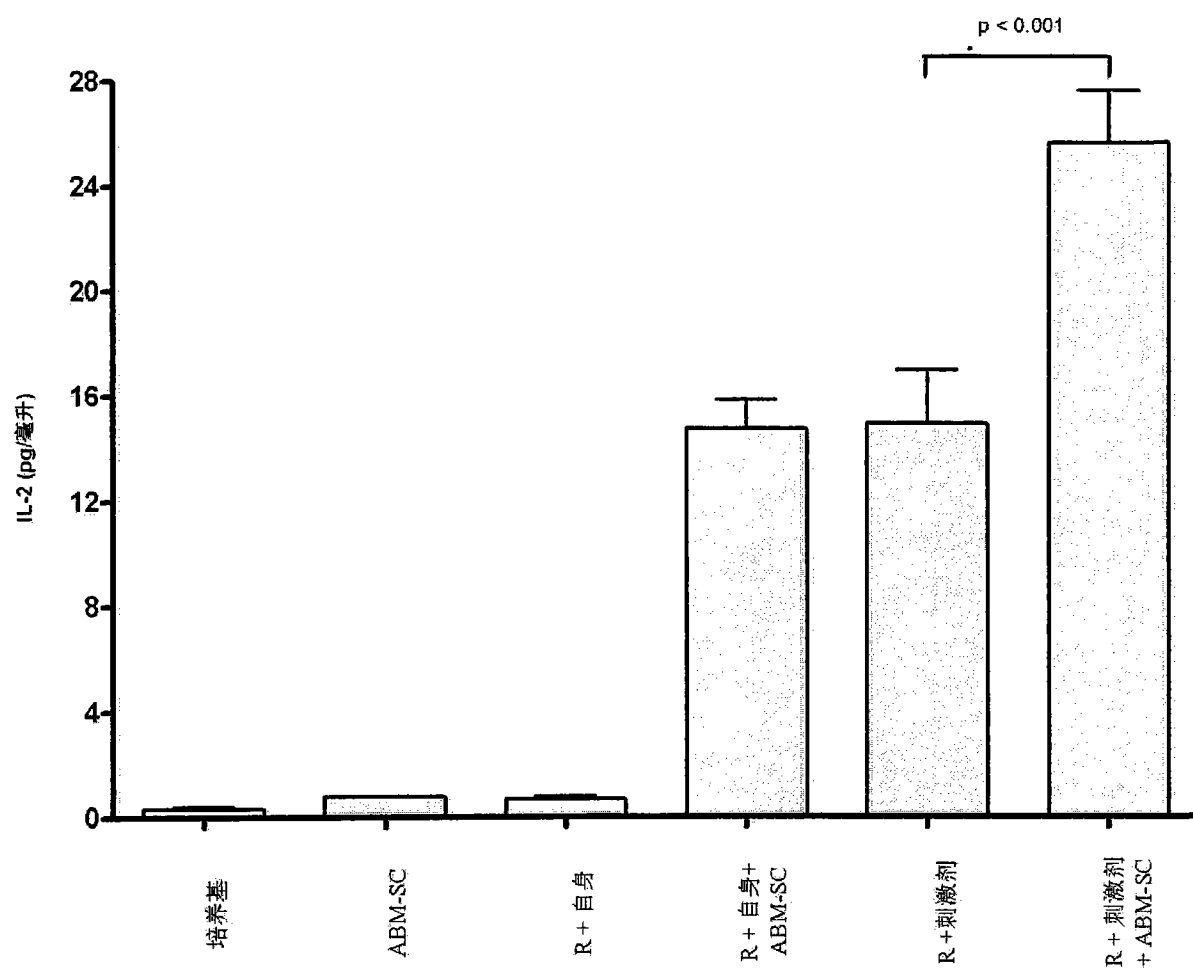


图 25C

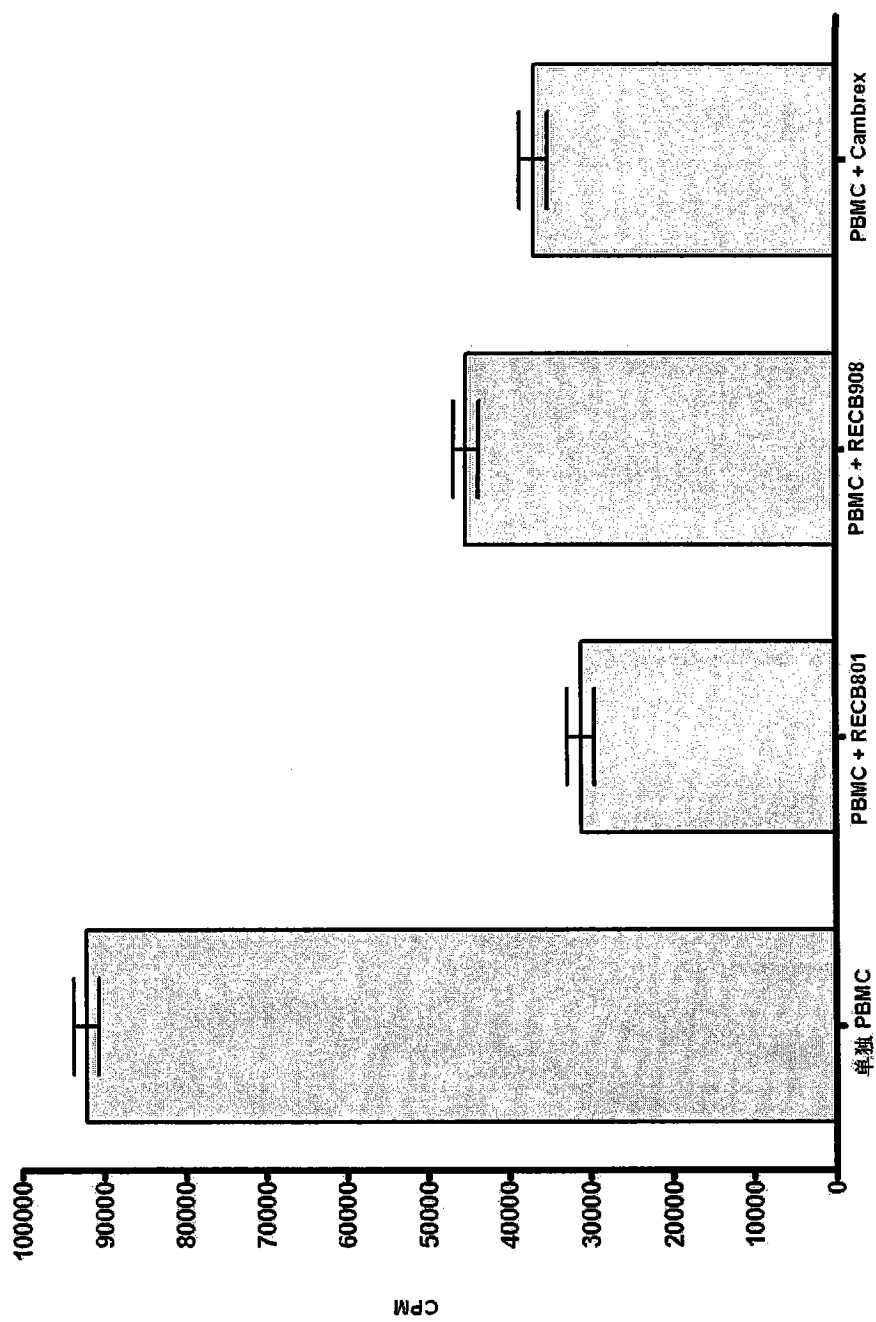


图 26