(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112410298 A
(43)申请公布日 2021.02.26

(21)申请号 202011283992.5

(22)申请日 2012.11.29

(30)优先权数据
61/566,492 2011.12.02 US

(62)分案原申请数据
201280067558.0 2012.11.29

(71)申请人 菲特治疗公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 丹·肖马克 大卫·罗宾斯
约翰·D·门德莱恩
卡罗琳·德斯邦特斯

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
C12N 5/0789(2010.01)
A61K 35/28(2015.01)
A61P 13/08(2006.01)
A61P 15/00(2006.01)
A61P 19/08(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 1/04(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 19/04(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
A61P 19/00(2006.01)
A61P 7/10(2006.01)
A61P 13/02(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 17/02(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 7/02(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61P 19/10(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 7/06(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 1/18(2006.01)
A61P 7/00(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)

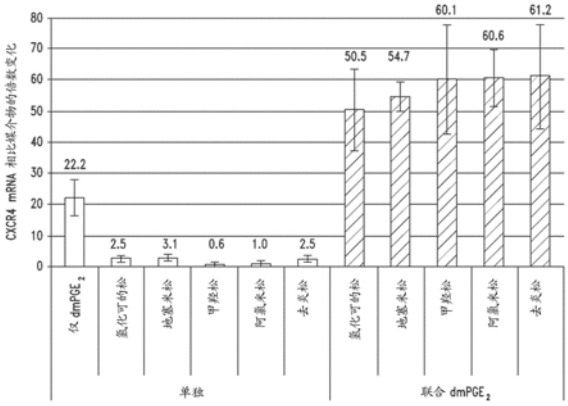
权利要求书2页 说明书60页 附图14页

(54)发明名称

增强的干细胞组合物

(57)摘要

本发明提供了改进的细胞疗法。具体而言，本发明提供了具有改善的移植和归巢性能的增强的造血干细胞和祖细胞治疗组合物，以及制备该治疗组合物的方法。本发明还提供了改进造血干细胞和祖细胞移植效能的方法，包括将治疗组合物移植到需要造血系统重建的对象。



CN 112410298 A

1.人造血干细胞或祖细胞,包括:

a)造血干细胞或祖细胞,其在离体下已与一种或多种增加所述细胞中CXCR4基因表达的试剂接触;以及

b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约30倍。

2.如权利要求1所述的造血干细胞或祖细胞,其中所述一种或多种试剂包括(i)一种或多种前列腺素通路激动剂;和(ii)一种或多种糖皮质激素。

3.包含细胞群的治疗组合物,所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞,其中:

a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与一种或多种增加人造血干细胞或祖细胞中CXCR4表达的试剂接触;以及

b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约30倍。

4.制备人造血干细胞或祖细胞的方法,包括

a)使所述造血干细胞或祖细胞在离体下与一种或多种增加所述细胞中CXCR4基因表达的试剂接触;其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约30倍。

5.制备治疗组合物的方法,包括:

使造血干细胞或祖细胞在离体下与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触;其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约30倍。

6.治疗需要细胞治疗的对象的方法,包括将权利要求1所述的人造血干细胞或祖细胞给予至所述对象。

7.增加对象中的造血干细胞和祖细胞归巢和/或移植的方法,包括将包含细胞群的组合物给予至对象,所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞,其中:

a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与增加所述细胞中的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触;并且

b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

8.增加对象中的造血干细胞和祖细胞归巢和/或移植的方法,包括将包含细胞群的组合物给予至对象,所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞,其中:

a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触;并且

b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

9.增加对象中的造血干细胞和祖细胞重建的方法,包括将包含细胞群的组合物给予至所述对象,所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞,其中:

a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与增加细胞中的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触;并且

b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因

表达增加为至少约30倍。

10.增加对象中的造血干细胞和祖细胞重建的方法，包括将包含细胞群的组合物给予至所述对象，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中：

a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触；并且

b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

增强的干细胞组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C.§119(e)要求2011年12月2日递交的美国临时申请第61/566,492号的权益,其通过引用整体并入本文。

[0003] 发明背景

技术领域

[0004] 本发明涉及增强的造血干细胞和祖细胞以及包含所述增强的细胞的治疗组合物。本发明还涉及制备增强的造血细胞和祖细胞及治疗组合物的方法,以及它们的使用方法,包括用于重建个体的造血系统以及治疗与缺血相关的病症和疾病。

[0005] 相关领域的描述

[0006] 再生医学的目标是维持、改善或甚至恢复损坏的或患病的细胞、组织和器官的功能。再生医学旨在变革医学实践的一种方式是采用基于细胞的疗法来治疗患者。然而,为了完全实现基于细胞的疗法的允诺,治疗性细胞在引入患者时应当可被很好地耐受,该细胞还应当迁移或“归巢”至需要治疗的位点,并且该细胞应当能够提供预期的治疗。本领域已尝试采用基于干细胞和祖细胞的疗法,但在人临床环境中取得的成功很少(如果有的话)。

[0007] 可从改进的基于细胞的疗法获益的一个再生医学领域为干细胞移植,例如,骨髓移植和造血干细胞移植以治疗各种遗传疾病、癌症和退行性疾病。根据美国国家骨髓库®(NMDP),估计全球范围内每年进行45,000-50,000例造血细胞移植,以治疗患有致命性的恶性和非恶性疾病的患者。然而,骨髓移植具有诸多弊端:骨髓捐赠是痛苦的,有时其较困难且找到匹配组织的HLA供体很耗时(并且常常不可能);并且异体移植与移植物抗宿主病(GVHD)的较大发生率相关。此外,尽管采用更容易得到的脐带血进行异体造血干细胞移植,脐带血移植仍然具有GVHD风险。脐带血移植的现存方法的其他弊端包括较少量的可移植细胞以及供体细胞不足的归巢和移植,这两种弊端均将患者置于高的致命性感染的风险中。另外,脐带血移植通常仍然具有与骨髓和外周血移植同样的风险。

[0008] 已尝试了许多方法来扩增离体环境下脐带血分离的移植物中人造血干细胞和祖细胞的数目,以降低GVHD发生率或增加细胞的归巢和移植能力,但是这些努力取得的成功有限。

[0009] 可从改进的基于细胞的疗法获益的再生医学另一领域是治疗由于缺血损坏的组织。流向组织和器官的血流的破坏被称为缺血。人体细胞、组织和器官的生存力取决于充足的血流。充足的血流提供给细胞氧气、葡萄糖和非常需要的营养物质,其对细胞生理和代谢的调节非常重要。缺血可为急性的或慢性的。急性和慢性形式的缺血均引起运往细胞的充足的营养物质的损失,且如果延长,将引起组织缺氧和/或缺氧性病症。如果缺血得不到治疗,细胞可能遭受坏死或凋亡,从而危害组织或器官的完整性和健康。

[0010] 在美国每年有数百万的患者受缺血影响。缺血几乎可由无限多种遗传病症、环境损害、外伤或手术干预引起。患者患有的最常见的缺血类型包括但不限于,脑缺血、脊髓损伤、心血管缺血、肢体缺血、肠缺血、皮肤缺血(例如,烧伤和冻疮),以及医疗和手术方案(包

括但不限于器官移植和皮肤移植)引起的缺血。

[0011] 当前,解决急性和慢性缺血需要恢复组织灌注和血流,通常采用手术方式,这将患者进一步置于缺血性组织损伤风险中。一段时间的缺血后恢复血流事实上能比缺血造成更大的破坏。氧的再引入造成产生更多的破坏性自由基,同时还通过消除胞外的酸中毒条件允许钙流入,从而造成钙超载。总之,这引起再灌注损伤,其可造成有可能致命的心律不整,同时还可极大地加速坏死。处理缺血性组织的其他现存的治疗方法包括高压氧、静脉溶栓、抗炎剂和局部施用血管生成促进剂。然而,这些疗法取得的成功通常有限(如果有的话)。

[0012] 因此,再生医学中使用的许多基于细胞的组合物和材料目前受成本限制、低效和/或不安全。在再生医学中使用基于干细胞和祖细胞的疗法的其他明显缺陷为,缺少可用于控制干细胞增殖、迁移或指导干细胞例如归巢至需要治疗的特定生境或组织的技术。最终结果为基于细胞的疗法不被看做是那些需要再生医学的人的现实治疗选择。

[0013] 因此,本领域迫切需要改进的基于细胞的疗法,其可扩展、能归巢至患者中需要治疗的位点,并能够提供持久的治疗效果。本发明解决了这些需要,并提供了其他相关的优势。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明总体提供了具有改善的治疗性能的新的基于细胞的组合物。在一个实施方案中,本发明部分包括人造血干细胞或祖细胞,其包含在离体下已与能增加所述细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触的造血干细胞或祖细胞,并且相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0016] 在一个具体的实施方案中,一种或多种试剂包含(i)一种或多种前列腺素通路激动剂;和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0017] 在某个具体的实施方案中,前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0018] 在又一个具体的实施方案中,前列腺素通路激动剂选自:PGE2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0019] 在另一具体的实施方案中,前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或衍生物。

[0020] 在又一个具体的实施方案中,前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0021] 在某个实施方案中,糖皮质激素选自:甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙(fluclorolone)、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、

泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0022] 在又一个实施方案中，糖皮质激素为甲羟松。

[0023] 在又一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触至少约1小时的时间。

[0024] 在另一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约24小时的时间。

[0025] 在另一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约12小时的时间。

[0026] 在另一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约6小时的时间。

[0027] 在一个具体实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约6小时的时间。

[0028] 在又一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约4小时的时间。

[0029] 在又一个其他实施方案中，细胞获自骨髓、脐带血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘或胎血。

[0030] 在一个实施方案中，本发明部分包括组合物，例如治疗组合物，其包含细胞群，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与能增加人造血干细胞或祖细胞的CXCR4表达的一种或多种试剂接触，且相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4表达增加为至少约30倍。

[0031] 在另一个实施方案中，一种或多种试剂包含(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0032] 在又一个具体实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约40倍。

[0033] 在又一个具体实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约50倍。

[0034] 在又一个具体实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约60倍。

[0035] 在又一个具体实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约70倍。

[0036] 在又一个具体实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约80倍。

[0037] 在又一个具体实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为约40至约80倍。

[0038] 在又一个具体实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为约50至约80倍。

[0039] 在又一个具体实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为约60至约80倍。

[0040] 在某些另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中

相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为约30、约40、约50、约60、约70或约80倍；并且其中相比未接触的干细胞或祖细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自透明质酸合成酶1(HAS1)、GTP-结合蛋白GEM(GEM)、双特异性蛋白磷酸酶4(DUSP4)、双调蛋白(AREG)、核受体相关蛋白(NR4A2)、肾素(REN)、cAMP-响应元件调节蛋白(CREM)、I型胶原α1链(COL1A1)和Fos-相关抗原2(FOSL2)的一种或多种基因的基因表达增加为至少约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约10倍、约20倍、约30倍、约40倍或约50倍。

[0041] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的一种或多种基因的基因表达增加为至少约2倍。

[0042] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的一种或多种基因的基因表达增加为至少约3倍。

[0043] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的一种或多种基因的基因表达增加为至少约5倍。

[0044] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的一种或多种基因的基因表达增加为至少约10倍。

[0045] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的两种或更多种基因的基因表达增加为至少约2倍。

[0046] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的两种或更多种基因的基因表达增加为至少约3倍。

[0047] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的两种或更多种基因的基因表达增加为至少约5倍。

[0048] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的两种或更多种基因的基因表达增加为至少约10倍。

[0049] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中

相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的3种或更多种基因的基因表达增加为至少约2倍。

[0050] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的3种或更多种基因的基因表达增加为至少约3倍。

[0051] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的3种或更多种基因的基因表达增加为至少约5倍。

[0052] 在其他另外的实施方案中，接触的造血干细胞或祖细胞包含基因表达信号，其中相比未接触的细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少30倍，并且其中相比未接触的细胞，处理的干细胞或祖细胞中选自HAS1、GEM、DUSP4、AREG、NR4A2、REN、CREM、COL1A1、FOSL2的3种或更多种基因的基因表达增加为至少约10倍。

[0053] 在另一个实施方案中，前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0054] 在又一个实施方案中，前列腺素通路激动剂选自：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0055] 在另一个实施方案中，前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或其衍生物。

[0056] 在另一实施方案中，前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0057] 在另一具体的实施方案中，糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯缩松、醋酸氟氯缩松、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0058] 在另一个实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与以下中的至少一种接触至少约1小时的时间：(i)一种或多种前列腺素通路激动剂或(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0059] 在又一个实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与以下中的至少一种接触约2小时至约24小时的时间：(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0060] 在又一个实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与以下中的至少一种接触约2小时至约6小时的时间：(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0061] 在一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与以下中的至少一种接触约4小时的时间：(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0062] 在某个实施方案中，细胞群包含少于约0.10％、0.50％、1.0％、3％、5％、10％、15％、20％或30％的$CD34^+$细胞。

[0063] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约0.01％且不大于约50％的$CD34^+$细胞。

[0064] 在另一实施方案中，细胞群包含至少约1％的$CD34^+$细胞。

[0065] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约3％的$CD34^+$细胞。

[0066] 在一个具体的实施方案中，细胞群包含至少约5％的$CD34^+$细胞。

[0067] 在另一个具体实施方案中，细胞群包含至少约10％的$CD34^+$细胞。

[0068] 在又一个具体实施方案中，细胞群包含至少约20％的$CD34^+$细胞。

[0069] 在又一个具体实施方案中，细胞群包含至少约30％的$CD34^+$细胞。

[0070] 在某个实施方案中，细胞群包含至少约40％的$CD34^+$细胞。

[0071] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约50％的$CD34^+$细胞。

[0072] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约60％的$CD34^+$细胞。

[0073] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约70％的$CD34^+$细胞。

[0074] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约80％的$CD34^+$细胞。

[0075] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约90％的$CD34^+$细胞。

[0076] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约95％的$CD34^+$细胞。

[0077] 在又一个实施方案中，细胞群未在离体下扩增。

[0078] 在某个实施方案中，组合物在现场即时产生，且被给予至患者而未经培养细胞群。

[0079] 在又一个实施方案中，组合物经过洗涤且基本上无一种或多种试剂。

[0080] 在另一实施方案中，细胞群获自骨髓、胎肝、胎血、胎盘、胎盘血、脐带血或动员的外周血。

[0081] 在一个实施方案中，本发明部分包括制备人造血干细胞或祖细胞的方法，包括使造血干细胞或祖细胞在离体下与能增加所述细胞的CXCR4基因表达一种或多种试剂接触；其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0082] 在一个具体的实施方案中，一种或多种试剂包含(i)一种或多种前列腺素通路激动剂;和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0083] 在某个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0084] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂选自：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0085] 在另一具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或衍生物。

[0086] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0087] 在某个实施方案中，糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可

的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0088] 在又一个实施方案中，糖皮质激素为甲羟松。

[0089] 在又一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触至少约1小时的时间。

[0090] 在另一个实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约24小时的时间。

[0091] 在另一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约6小时的时间。

[0092] 在一个具体实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约6小时的时间。

[0093] 在又一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约4小时的时间。

[0094] 在又一个其他实施方案中，细胞获自骨髓、脐带血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘或胎血。

[0095] 在一个实施方案中，本发明部分包括制备治疗组合物的方法，包括使造血干细胞或祖细胞在离体下与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触；其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0096] 在一个具体的实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约40倍。

[0097] 在某个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE2 EP2或PGE2 EP4受体的化合物。

[0098] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂选自：PGE2、dmPGE_2、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0099] 在另一具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或衍生物。

[0100] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0101] 在某个实施方案中，糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、

双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0102] 在又一个实施方案中，糖皮质激素为甲羟松。

[0103] 在一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触至少约1小时的时间。

[0104] 在又一个具体的实施中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约24小时的时间。

[0105] 在又一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素与接触约2小时至约12小时的时间。

[0106] 在又一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约6小时的时间。

[0107] 在另一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约4小时的时间。

[0108] 在另一个具体实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约4小时的时间。

[0109] 在某个实施方案中，细胞群包含少于约0.10％、0.50％、1.0％、3％、5％、10％、15％、20％或30％的$CD34^+$细胞。

[0110] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约0.01％且不大于约50％的$CD34^+$细胞。

[0111] 在另一实施方案中，细胞群包含至少约1％的$CD34^+$细胞。

[0112] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约3％的$CD34^+$细胞。

[0113] 在一个具体的实施方案中，细胞群包含至少约5％的$CD34^+$细胞。

[0114] 在另一个具体实施方案中，细胞群包含至少约10％的$CD34^+$细胞。

[0115] 在又一个具体实施方案中，细胞群包含至少约20％的$CD34^+$细胞。

[0116] 在又一个具体实施方案中，细胞群包含至少约30％的$CD34^+$细胞。

[0117] 在某个实施方案中，细胞群包含至少约40％的$CD34^+$细胞。

[0118] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约50％的$CD34^+$细胞。

[0119] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约60％的$CD34^+$细胞。

[0120] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约70％的$CD34^+$细胞。

[0121] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约80％的$CD34^+$细胞。

[0122] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约90％的$CD34^+$细胞。

[0123] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约95％的$CD34^+$细胞。

[0124] 在另一个实施方案中，细胞群未在离体下扩增。

[0125] 在某个实施方案中，组合物在现场即时产生，且被给予至患者而未经培养细胞群。

[0126] 在又一个实施方案中，组合物经过洗涤且基本上无一种或多种试剂。

[0127] 在另一实施方案中，细胞群获自骨髓、胎肝、胎血、胎盘、胎盘血、脐带血或动员的外周血。

[0128] 在不同的实施方案中，本发明部分包括治疗需要细胞疗法的对象的方法，包括将人造血干细胞或祖细胞给予至所述对象，其中所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与能增加人造血干细胞或祖细胞的CXCR4表达的一种或多种试剂接触，并且相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0129] 在一个具体实施方案中，对象患有急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、青少年髓单核细胞性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、严重型再生不良性贫血、范康尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、纯红细胞再生障碍、巨核细胞缺乏/先天性血小板减少症、重症复合性免疫缺陷综合征(SCID)、威斯科特-奥尔德里奇综合征、β-重型地中海贫血、镰状细胞疾病、赫尔勒综合征、肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质病变、脊髓发育不良、难治性贫血、慢性髓单核细胞白血病、特发性髓样化生、家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症、实体瘤、慢性肉芽肿性疾病、黏多醣症或Diamond Blackfan贫血。

[0130] 在某个实施方案中，对象患有乳腺癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或肉瘤。

[0131] 在另一实施方案中，对象已接受了骨髓消融或非清髓性化疗或放射治疗。

[0132] 在又一个实施方案中，对象为骨髓供体。

[0133] 在一个实施方案中，对象具有缺血性组织或由于缺血损坏的组织。

[0134] 在一个具体的实施方案中，对象患有至少一种与缺血性组织或由于缺血损坏的组织相关的症状。

[0135] 在不同的实施方案中，所述缺血与以下相关：急性冠脉综合征、急性肺损伤(ALI)、急性心肌梗塞(AMI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、动脉闭塞性疾病、动脉硬化、关节软骨缺损、无菌性全身性炎症、动脉粥样硬化性心血管疾病、自身免疫疾病、骨折、骨折、脑水肿、脑低灌、柏格氏疾病、烧伤、癌症、心血管疾病、软骨损伤、脑梗塞、脑缺血、脑中风、脑血管疾病、化疗引起的神经病、慢性感染、慢性肠系膜缺血、跛行、充血性心脏衰竭、结缔组织损伤、挫伤、冠状动脉疾病(CAD)、严重肢体缺血(CLI)、克罗恩氏疾病、深静脉血栓形成、深度伤口、溃疡愈合延迟、伤口愈合延迟、糖尿病(I型和II型)、糖尿病性神经病变、糖尿病引起的缺血、弥散性血管内凝血(DIC)、栓塞性脑缺血、移植物抗宿主病、遗传性出血性毛细管扩张缺血性血管疾病、高氧损伤、组织缺氧、炎症、炎症性肠病、炎症性疾病、肌腱受伤、间歇性跛行、肠缺血、局部缺血、缺血性脑疾病、缺血性心脏病、缺血性周围血管疾病、缺血性胎盘、缺血性肾脏疾病、缺血性血管疾病、缺血再灌注损伤、裂伤、左冠状动脉主干病变、肢体缺血、下肢缺血、心肌梗塞、心肌缺血、器官缺血、骨关节炎、骨质疏松、骨肉瘤、帕金森氏病、外周动脉性疾病(PAD)、外周动脉疾病、外周局部缺血、周围神经病、周围血管疾病、初癌、肺水肿、肺栓塞、重构紊乱、肾缺血、视网膜缺血、视网膜病、败血症、皮肤溃疡、实体器官移植、脊椎损伤、中风、软骨下骨囊肿、血栓形成、血栓性脑缺血、组织缺血、短暂性脑缺血发作(TIA)、外伤性脑损伤、溃疡性结肠炎、肾血管疾病、血管炎性病症、希佩尔-林道综合征和组织或器官创伤。

[0136] 在一个实施方案中，本发明部分包括增加对象中的造血干细胞和祖细胞归巢和/或移植的方法，包括将包含细胞群的组合物给予至所述对象，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触；并且相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0137] 在一个具体的实施方案中，一种或多种试剂包含(i)一种或多种前列腺素通路激动剂；和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0138] 在某个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0139] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂选自：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0140] 在另一具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或衍生物。

[0141] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0142] 在某个实施方案中，糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0143] 在又一个实施方案中，糖皮质激素为甲羟松。

[0144] 在又一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触至少约1小时的时间。

[0145] 在另一个实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约24小时的时间。

[0146] 在另一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约6小时的时间。

[0147] 在一个具体实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约6小时的时间。

[0148] 在又一个实施方案中，干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约4小时的时间。

[0149] 在又一个其他实施方案中，细胞获自骨髓、脐带血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘或胎血。

[0150] 在一个实施方案中，本发明包括增加对象中的造血干细胞和祖细胞归巢和/或移植的方法，包括将包含细胞群的组合物给予至所述对象，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触；并且相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0151] 在一个具体的实施方案中，相比未接触的造血干细胞或祖细胞，接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4的基因表达增加为至少约40倍。

[0152] 在某个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0153] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂选自：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0154] 在另一具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或衍生物。

[0155] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0156] 在某个实施方案中，糖皮质激素选自甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0157] 在又一个实施方案中，糖皮质激素为甲羟松。

[0158] 在一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触至少约1小时的时间。

[0159] 在又一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约6小时的时间。

[0160] 在又一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约4小时的时间。

[0161] 在另一个具体实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约4小时的时间。

[0162] 在某个实施方案中，细胞群包含少于约0.10％、0.50％、1.0％、3％、5％、10％、15％、20％或30％的$CD34^+$细胞。

[0163] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约0.01％且不大于约50％的$CD34^+$细胞。

[0164] 在另一实施方案中，细胞群包含至少约1％的$CD34^+$细胞。

[0165] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约3％的$CD34^+$细胞。

[0166] 在一个具体的实施方案中，细胞群包含至少约5％的$CD34^+$细胞。

[0167] 在另一个具体实施方案中，细胞群包含至少约10％的$CD34^+$细胞。

[0168] 在又一个具体实施方案中，细胞群包含至少约20％的$CD34^+$细胞。

[0169] 在又一个具体实施方案中，细胞群包含至少约30％的$CD34^+$细胞。

[0170] 在某个实施方案中，细胞群包含至少约40％的$CD34^+$细胞。

[0171] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约50％的$CD34^+$细胞。

[0172] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约60％的$CD34^+$细胞。

[0173] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约70％的$CD34^+$细胞。

[0174] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约80％的$CD34^+$细胞。

[0175] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约90％的$CD34^+$细胞。

[0176] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约95％的$CD34^+$细胞。

[0177] 在另一个实施方案中，细胞群未在离体下扩增。

[0178] 在某个实施方案中，组合物在现场即时产生，且被给予至患者而未经培养细胞群。

[0179] 在又一个实施方案中，组合物经过洗涤且基本上无一种或多种试剂。

[0180] 在另一实施方案中，细胞群获自骨髓、胎肝、胎血、胎盘、胎盘血、脐带血或动员的外周血。

[0181] 在各个前述实施方案中，所述对象患有急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、青少年髓单核细胞性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、严重型再生不良性贫血、范康尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、纯红细胞再生障碍、巨核细胞缺乏/先天性血小板减少症、重症复合性免疫缺陷综合征(SCID)、威斯科特-奥尔德里奇综合征、β-重型地中海贫血、镰状细胞疾病、赫尔勒综合征、肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质病变、脊髓发育不良、难治性贫血、慢性髓单核细胞白血病、特发性髓样化生、家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症或实体瘤。

[0182] 在几个前述实施方案中，所述对象患有乳腺癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或肉瘤。

[0183] 在任何前述实施方案中，所述对象已接受了骨髓消融或非清髓性化疗或放射治疗。

[0184] 在前述具体实施方案中，所述对象为骨髓供体。

[0185] 在某些前述实施方案中，细胞群为所述对象自体的。

[0186] 在几个前述实施方案中，细胞群从所述对象的外周血或骨髓动员而来。

[0187] 在各个前述实施方案中，细胞群对所述对象为同种异体的。

[0188] 在一个实施方案中，本发明部分包括增加对象中的造血干细胞和祖细胞重建的方法，包括将包含细胞群的组合物给予至所述对象，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与能增加所述细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触；并且相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0189] 在一个具体的实施方案中，一种或多种试剂包含(i)一种或多种前列腺素通路激

动剂;和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0190] 在某个具体的实施方案中,前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0191] 在又一个具体的实施方案中,前列腺素通路激动剂选自:PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0192] 在另一具体的实施方案中,前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或衍生物。

[0193] 在又一个具体的实施方案中,前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0194] 在某个实施方案中,糖皮质激素选自:甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0195] 在又一个实施方案中,糖皮质激素为甲羟松。

[0196] 在又一个实施方案中,干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触至少约1小时的时间。

[0197] 在另一个实施方案中,造血干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约24小时的时间。

[0198] 在另一个实施方案中,干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约6小时的时间。

[0199] 在一个具体实施方案中,干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约6小时的时间。

[0200] 在又一个实施方案中,干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约4小时的时间。

[0201] 在又一个其他实施方案中,细胞获自骨髓、脐带血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘或胎血。

[0202] 在一个实施方案中,本发明部分包括增加对象中的造血干细胞和祖细胞重建的方法,包括将包含细胞群的组合物给予至所述对象,所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞,其中所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触;并且b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0203] 在一个具体的实施方案中,相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血

干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约40倍。

[0204] 在某个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0205] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂选自：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE2。

[0206] 在另一具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括PGE_2或PGE_2类似物或衍生物。

[0207] 在又一个具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0208] 在某个实施方案中，糖皮质激素选自甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0209] 在又一个实施方案中，糖皮质激素为甲羟松。

[0210] 在一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触至少约1小时的时间。

[0211] 在又一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约6小时的时间。

[0212] 在又一个具体的实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约4小时的时间。

[0213] 在另一个具体实施方案中，造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约4小时的时间。

[0214] 在某个实施方案中，细胞群包含少于约0.10％、0.50％、1.0％、3％、5％、10％、15％、20％或30％的$CD34^+$细胞。

[0215] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约0.01％且不大于约50％的$CD34^+$细胞。

[0216] 在另一实施方案中，细胞群包含至少约1％的$CD34^+$细胞。

[0217] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约3％的$CD34^+$细胞。

[0218] 在一个具体的实施方案中，细胞群包含至少约5％的$CD34^+$细胞。

[0219] 在另一个具体实施方案中，细胞群包含至少约10％的$CD34^+$细胞。

[0220] 在又一个具体实施方案中，细胞群包含至少约20％的$CD34^+$细胞。

[0221] 在又一个具体实施方案中，细胞群包含至少约30％的$CD34^+$细胞。

[0222] 在某个实施方案中，细胞群包含至少约40％的$CD34^+$细胞。

[0223] 在另一个实施方案中，细胞群包含至少约50％的$CD34^+$细胞。

[0224] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约60％的$CD34^+$细胞。

[0225] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约70％的$CD34^+$细胞。

[0226] 在又一个实施方案中，细胞群包含至少约80％的$CD34^+$细胞。

[0227] 在另一个其他实施方案中，细胞群包含至少约90％的$CD34^+$细胞。

[0228] 在又一个其他实施方案中，细胞群包含至少约95％的$CD34^+$细胞。

[0229] 在又一个实施方案中，细胞群未在离体下扩增。

[0230] 在某个实施方案中，组合物在现场即时产生，且被给予至患者而未经培养细胞群。

[0231] 在又一个实施方案中，组合物经过洗涤且基本上无一种或多种试剂。

[0232] 在另一实施方案中，细胞群获自骨髓、胎肝、胎血、胎盘、胎盘血、脐带血或动员的外周血。

[0233] 在各种实施方案中，细胞群包含一种或多种脐带血单元。

[0234] 在各个前述实施方案中，所述对象患有急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、青少年髓单核细胞性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、严重型再生不良性贫血、范康尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、纯红细胞再生障碍、巨核细胞缺乏/先天性血小板减少症、重症复合性免疫缺陷综合征(SCID)、威斯科特-奥尔德里奇综合征、β-重型地中海贫血、镰状细胞疾病、赫尔勒综合征、肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质病变、脊髓发育不良、难治性贫血、慢性髓单核细胞白血病、特发性髓样化生、家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症或实体瘤。

[0235] 在几个前述实施方案中，所述对象患有乳腺癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或肉瘤。

[0236] 在任何前述实施方案中，所述对象已接受了骨髓消融或非清髓性化疗或放射治疗。

[0237] 在前述具体实施方案中，所述对象为骨髓供体。

[0238] 在某些前述实施方案中，细胞群为所述对象自体的。

[0239] 在几个前述实施方案中，细胞群从所述对象的外周血或骨髓动员而来。

[0240] 在各个前述实施方案中，细胞群对所述对象是同种异体的。

附图说明

[0241] 图1显示了用10μM的单一试剂或10μM dmPGE2与10μM的5种不同糖皮质激素中一种的组合处理细胞时，检测到的人脐带血$CD34^+$细胞中CXCR4 mRNA水平的增加(相对于媒介物处理)。糖皮质激素与$dmPGE_2$协同作用来增加CXCR4基因表达。

[0242] 图2A-2C显示了用以下试剂处理$CD34^+$细胞时，检测到的人脐带血$CD34^+$细胞中CXCR4 mRNA的增加：仅PGE_2或PGE_2与不同糖皮质激素的组合(图2A)；仅15(S)-15-甲基PGE_2($mPGE_2$)或与不同糖皮质激素的组合(图2B)；或仅20-乙基PGE_2($ePGE_2$)或与不同糖皮质激素的组合(图2C)。数据表明，糖皮质激素与前列腺素通路激动剂协同作用来增加$CD34^+$细胞中的CXCR4基因表达。

[0243] 图3显示了用仅前列腺素通路激动剂或与糖皮质激素的组合处理$CD34^+$细胞时，检测到的来源于脐带血或动员的外周血(mPB)的人$CD34^+$细胞中的CXCR4 mRNA的增加。$CD34^+$细

胞对处理的响应类似，而与$CD34^+$细胞的来源无关。

[0244] 图4A-4B显示了用仅前列腺素通路激动剂或与糖皮质激素的组合处理$CD34^+$细胞后，表达CXCR4表面蛋白的$CD34^+$细胞数目增加(图4A)，表示为%$CXCR4^+$，以及以平均荧光强度(MFI)测量的$CD34^+$细胞上CXCR4表面蛋白的量增加(图4B)。

[0245] 图5显示了2小时处理期间和在用仅前列腺素通路激动剂或与糖皮质激素的组合处理$CD34^+$细胞后去除处理后(仅介质)的另外4小时，检测到的CXCR4 mRNA的增加(倍数变化)和表达表面CXCR4蛋白的人$CD34^+$细胞数(%细胞$CXCR4^+$)的动态测量。

[0246] 图6显示了4小时处理期间和在用仅前列腺素通路激动剂或与糖皮质激素的组合处理$CD34^+$细胞后去除处理后(仅介质)的另外4小时，检测到的CXCR4 mRNA的增加(倍数变化)和表达表面CXCR4蛋白的人$CD34^+$细胞数(%细胞$CXCR4^+$)的动态测量。

[0247] 图7显示了来自典型的SDF-1Transwell迁移分析的结果。结果表明了用DMSO对照、$dmPGE_2$或$dmPGE_2$及甲羟松处理$CD34^+$细胞对细胞向SDF-1迁移效率的影响。数据表明，相比用媒介物或仅前列腺素通路激动剂处理的$CD34^+$细胞，用前列腺素通路激动剂和糖皮质激素组合处理的$CD34^+$细胞向SDF-1梯度迁移的能力增强。该结果表明，用前列腺素通路激动剂与糖皮质激素组合处理的细胞其CXCR4基因表达的增加转化为功能能力的增加。

[0248] 图8显示了细胞向用仅$dmPGE^2$或与不同糖皮质激素的组合处理的$CD34^+$细胞的SDF-1迁移的效率。相比用媒介物或仅前列腺素通路激动剂处理的$CD34^+$细胞，用前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合处理的$CD34^+$细胞显示了增加的向SDF-1梯度迁移的能力。

[0249] 图9显示了用前列腺素通路激动剂与糖皮质激素组合处理$CD34^+$细胞后其增强的迁移能力的持续时间。结果表明，在处理$CD34^+$细胞后，增强的迁移能力持续时间维持了至少4小时。

[0250] 图10显示了典型的大脑中动脉闭塞模型(MCAO)缺血大鼠模型造成的神经功能缺损评分(mNSS)。结果显示了在MCAO中风模型中，用$dmPGE_2$和甲羟松处理HSPC细胞对细胞减少神经功能缺损的能力的影响。相比给予未经处理的细胞或仅媒介物的大鼠，给予了用前列腺素通路激动剂与糖皮质激素组合处理过的HSPC的大鼠，其神经功能缺损得到减少，且神经功能得到改善。

[0251] 图11显示了典型的大脑中动脉闭塞模型(MCAO)缺血大鼠模型造成的脚误检测。结果显示了在MCAO中风模型中，用$dmPGE_2$和甲羟松处理HSPC对细胞减少运动损伤的能力的影响。相比给予未经处理的细胞或仅媒介物的大鼠，给予了用前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合处理过的HSPC的大鼠的运动损伤得到改善。

[0252] 发明详述

[0253] A.综述

[0254] 本发明提供了在离体下经过处理以增强细胞治疗性能的人造血干细胞和祖细胞。具体而言，通过用能增加涉及归巢的基因的基因表达的一种或多种试剂简短处理细胞，在离体下对本发明的造血干细胞和祖细胞进行修饰。在一个实施方案中，通过用能增加CXCR4表达的一种或多种试剂简短地处理细胞，在离体下对本发明的造血干细胞和祖细胞进行修饰。相比未处理的人造血干细胞和祖细胞，本发明的治疗细胞表达了出乎意料高水平的CXCR4。在具体的实施方案中，本发明药理学上增强的细胞的特征为，相比未处理细胞其CXCR4基因表达增加为至少约30倍。在各种实施方案中，所述治疗细胞为$CD34^+$细胞。

[0255] 据信CXCR4与造血干细胞和祖细胞的增加的归巢和移植相关，因此本发明的处理的造血干细胞和祖细胞具有增强的治疗性能，包括例如增加的归巢至骨髓和缺血损坏的组织，以及增强的增殖和再生性能。

[0256] 在各种实施方案中，本发明的细胞和包含此类增强的细胞的组合物可用于治疗病症和病患，其中增加的造血干细胞数和祖细胞数是必需的或是有利的，包括造血干细胞细胞移植和治疗缺血损坏的组织等疗法。撇开理论的束缚，本发明部分包括，在本发明的增强的造血干细胞和祖细胞表面上的CXCR4蛋白水平的增加，改善了增强的细胞归巢至骨髓和组织损伤位点。通过增加干细胞移植中使用的造血干细胞和祖细胞的效力，包括例如，通过增加处理的细胞归巢和/或移植至骨髓，并在给予至患者后增加处理的细胞在体内自我更新和增殖的能力，所述增强的造血干细胞和祖细胞可改善干细胞移植期间的患者结果。

[0257] 通过例如，改善缺血性组织的血管形成、改善缺血位点的组织再生、降低缺血性组织坏死或细胞凋亡和/或增加缺血位点的细胞存活，本发明的增强的造血干细胞和祖细胞在用于治疗缺血性组织或缺血损坏的组织时可改善患者结果。

[0258] B.定义

[0259] 本文所用的冠词(“a/an”和“the”)指一个或多于一个(即，至少一个)该冠词的语法宾语。例如，“元件”指一个元件或多于一个元件。

[0260] 使用替代选择(例如，“或”)应当理解为指替代选择中的一个、两个或其任何组合。如本文所用，术语“包括/包含(include/comprise)”作为同义词使用。

[0261] 如本文所用，术语“约(about/approximately)”指与参考的数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度相差达15％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或1％的数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。在一个实施方案中，术语“约(about或approximately)”指关于参考的数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度，±15％、±10％、±9％、±8％、±7％、±6％、±5％、±4％、±3％、±2％或±1％的数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的范围。

[0262] 术语“离体”通常指生物体外发生的活动，如在生物体外的人工环境(优选将对自然条件改变最小化)中，在活组织中或活组织上进行的实验或测量。在具体的实施方案中，“离体”方案包括取自生物体的活细胞或组织，其通常在无菌条件下培养于实验装置中，且通常培养几小时或多达约24小时，但包括培养多达48或72小时，视情况而定。在某些实施方案中，可将此类组织或细胞采集并冷冻，然后解冻用于离体处理。采用活细胞或组织进行持续长于几天的组织培养实验或方案通常被认为是“体外的”，尽管在某些实施方案中，该术语可与离体互换使用。

[0263] 表述“离体给予”、“离体处理”或“离体治疗应用”通常涉及这样的医疗方案，其中一种或多种器官、细胞或组织获自活的或刚死亡的对象，任选为纯化的/富集的，并被暴露于治疗或方案(例如，离体给予步骤，其涉及将细胞与本发明的组合物或试剂一起孵育，以增加特定细胞如造血干细胞或祖细胞扩增)。可将离体处理的细胞给予至供体或不同的活体对象。

[0264] 此类离体治疗应用还可包括任选的体内处理或程序化步骤，如通过将本发明的接触的细胞一次或多次给予至活体对象。这些实施方案包括根据本领域熟知的技术和按本文

其他地方描述进行的局部和全身给药。给予至对象的细胞的量取决于所述对象的特性，如总体健康状况、年龄、性别、体重和对药物耐受性，以及对药物和/或细胞移植的反应程度、严重性和类型。

[0265] 术语“体内”通常指生物体内发生的活动，如细胞移植、细胞归巢、细胞自我更新和细胞扩增。在一个实施方案中，术语“体内扩增”指体内细胞群增加数目的能力。在具体的实施方案中，体内扩增包括干细胞的自我更新和/或扩增。

[0266] “增强”或“促进”，或者“增加”或“激活”通常指，相比媒介物或对照分子/组合物所引起的反应，试剂在细胞中产生或引起更大生理反应(即，下游效应)的能力，例如，造血干细胞和祖细胞的增加的移植/移植潜能和增加的体内干细胞扩增。可测量的生理反应可包括造血干细胞和祖细胞移植、生存力、归巢、自我更新和/或扩增以及其他根据本领域的认知和本文的描述显而易见的类型的增加。在一个实施方案中，所述增加可以为通过PGE_2R_2和/或PGE_2R_4细胞信号转导通路的信号转导的增加引起的基因表达的增加，包括但不限于CREB磷酸化的增加、CREM表达的增加和CXCR4表达的增加。还可以使用本领域已知的方法如基因表达、CFU-C测定、CFU-S测定、CAFC测定和细胞表面蛋白表达等，来确定造血干细胞和祖细胞移植、生存力、归巢、自我更新和/或体内扩增的增加。“增加的”或“提高的”量通常为“统计学显著的”量，并且可以包括媒介物(没有试剂)或对照组合物产生的反应的1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如，500、1000倍)(包括其间的且大于1的所有整数和小数，例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的增加。

[0267] “减小(decrease)”或“降低(lower)”或“缩小(lessen)”或“减少(reduce)”或“减轻(abate)”通常指，相比媒介物或对照分子/组合物引起的反应，试剂在细胞中引起或产生较少的生理反应(即，下游效应)的能力，例如减少的凋亡。在一个实施方案中，所述减少可以是基因表达的减少或通常与细胞生存力下降相关的细胞信号转导的减少。“减小的”或“减少的”量通常是“统计学显著的”量，并且可以包括媒介物(没有试剂)或对照组合物引起的反应的1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多被倍(例如，500、1000倍)(包括其间的且大于1的所有整数和小数，例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的减少。

[0268] “维持(maintain)”或“保存”或“维持(maintenance)”或“无改变”或“无大的改变”或“无大的减少”通常指，相比媒介物或对照分子/组合物引起的反应(参照反应)，试剂在细胞中产生或引起可比较的生理反应(即，下游效应)的能力。可比较的反应是与参照反应无显著差异或可测量差异的反应。

[0269] 在整个本说明书中，除非上下文另有要求，词语“包括(comprise)”、“包括(comprises)”和“包括(comprising)”应理解为，意指包括所陈述的步骤或元件或者步骤或元件的组，但不排除任何其他的步骤或元件或者步骤或元件的组。“由…组成”意指包括并且限于短语“由…组成”之后的任何内容。因此，短语“由…组成”指所列元件是需要的或必需的，并且不可能存在其他元件。通过“基本上由…组成”意指包括该短语之后所列的任何元件，并且限制于不干扰或有助于针对所列元件本公开所指的活性或作用的其他元件。因此，短语“基本上由…组成”指所列元件是需要的或必需的，但没有其他元件是任选的，而根据其是否影响所列元件的活性或作用可以或不可以存在。

[0270] 在某些实施方案中，本发明的治疗细胞包含独特的或实质上独特的基因信号。如本文所用，术语“基因表达谱”、“基因表达信号”或“基因信号”指针对相同样品即细胞群所

测得的多个不同基因的表达水平。可以定义基因表达信号，以便确定一组基因为将所述治疗细胞区别于本领域现存的细胞和/或对照、媒介物或未处理的细胞的“信号基因”。

[0271] 如本文所用，“信号基因”是指信号基因集中的任何基因。例如，信号基因包括透明质酸合成酶1(HAS1)、GTP-结合蛋白GEM(GEM)、双特异性蛋白磷酸酶4(DUSP4)、双调蛋白(AREG)、核受体相关蛋白(NR4A2)、肾素(REN)、cAMP-响应元件调节蛋白(CREM)、I型胶原α1链(COL1A1)、Fos-相关抗原2(FOSL2)和CXC趋化因子受体4(CXCR4)。为清楚起见，信号基因不包括看家基因。

[0272] 如本文所用，“基因表达”指生物样品，如干细胞和祖细胞或者包含干细胞或祖细胞的细胞群中基因的相对表达水平和/或表达谱。在具体的实施方案中，干细胞或祖细胞为造血干细胞和祖细胞。

[0273] 本文包括本领域可用于检测用来定征包含本发明治疗组合物的细胞的基因表达的任何方法。如本文所用，术语“检测表达”指确定基因的RNA转录物或其表达产物的量或存在。检测基因表达即基因表达谱的方法包括基于多核苷酸杂交分析的方法、基于多核苷酸测序的方法、免疫组织化学方法和基于蛋白质组的方法。所述方法通常检测目的基因的表达产物(例如mRNA)。在一些实施方案中，使用了基于PCR的方法如反转录PCR(RT-PCR)(Weis et al.,TIG 8:263-64,1992)，和基于阵列的方法如微阵列(Schena et al.,Science 270:467-70,1995)。

[0274] 整个本说明书中提及的“一个实施方案”或“实施方案”指结合所述实施方案描述的特定特征、结构或特性被包括在本发明的至少一个实施方案中。因此，整个本说明书的各个地方出现的短语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”未必都指相同的实施方案。此外，可以任何合适的方式将具体的特征、结构或特性组合到一种或多种实施方案中。

[0275] C.造血干细胞和祖细胞

[0276] 本发明提供了人造血干细胞和祖细胞，其中所述干细胞在离体下已与能增加所述细胞的治疗性能的一种或多种试剂接触。在一个实施方案中，人造血干细胞和祖细胞在离体下已与能增加所述细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触。在一个优选的实施方案中，相比未接触的造血干细胞和祖细胞或者以媒介物对照处理的细胞，处理的人造血干细胞细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0277] 造血干细胞细胞是专能(multipoetnt)干细胞，其能产生生物体的所有血细胞类型，包括骨髓细胞(例如，单核细胞和巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红血球、巨核细胞/血小板、树状细胞)，以及淋巴谱系(例如，T细胞、B细胞、NK细胞)，以及本领域已知的其他细胞(参见Fei,R.,et al.,美国专利第5,635,387号;McGlave,et al.,美国专利第5,460,964号;Simmons,P.,et al,美国专利第5,677,136号;Tsukamoto,et al.,美国专利第5,750,397号;Schwartz,et al.,美国专利第5,759,793号;DiGuisto,et al.,美国专利第5,681,599号;Tsukamoto,et al.,美国专利第5,716,827号)。造血祖细胞(HSC)产生定向造血祖细胞(HPC)，其能在生物体的整个寿命中产生全部类型的成熟血细胞。

[0278] 如本文所用，术语“造血干细胞和祖细胞”或“HSPC”指通过抗原标记CD34(CD34$^+$)的存在来鉴定的细胞，并因此被表征为CD34$^+$细胞和此类细胞的细胞群。在具体的实施方案中，术语“HSPC”指通过抗原标记CD34(CD34$^+$)的存在和谱系(lin)标记的缺乏来鉴定的细胞，并因此被表征为CD34$^+$/Lin(-)细胞和此类细胞的细胞群。公认包含CD34$^+$和/或Lin(-)细

胞的细胞群还包含造血祖细胞，因此为了本申请的目的，术语“HSPC”包括造血祖细胞。

[0279] “增强的造血干细胞和祖细胞”或“增强的HSPC”指离体下以一种或多种试剂处理的HSPC，其中相比对照、媒介物或未处理的细胞，所述试剂能将细胞中的CXCR4基因表达增加至少约30倍。

[0280] 如本文所用，“未接触的”或“未处理的”细胞是未以除对照试剂外的试剂处理例如培养、接触或孵育的细胞。以DMSO(对照试剂)接触，或以另一媒介物接触的细胞为未接触的细胞。

[0281] 本发明的HSPC通过指示高水平的CXCR4表达的基因表达谱进行确定和定征。HSPC还可以基于增加的CXCR4基因表达和增加的CXCR4多肽的细胞表面表达进行定征。在某些实施方案中，相比未接触的细胞的CXCR4表达，本发明HSPC的CXCR4基因表达增加为至少30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100倍。

[0282] 在具体的实施方案中，相比未处理的HSPC，HSPC的CXCR4基因表达增加为约30至约80倍。在其他实施方案中，相比未处理的HSPC，HSPC的CXCR4基因表达增加为约40至约80倍、约50至约80倍、约60至约80倍或约50至约70倍。

[0283] 可在以一种或多种试剂处理细胞后测定本发明处理的HSPC的CXCR4基因表达或基因表达信号。例如，可在离体下以一种或多种试剂处理HSPC，洗涤以去除此试剂，并且不经进一步孵育细胞而分析基因表达。

[0284] 还可以多种和不同的其他方式定征本发明方法中接触的且具有增强的治疗性能的人HSPC，如通过细胞内cAMP信号转导(例如，CREB磷酸化，或通过生化检测测定的)的增加的水平；通过基因表达检测例如微阵列测定的，指示涉及PGE_2R_2/R_4细胞信号转导通路的基因如CREM上调的基因表达信号，以及指示增加干细胞和祖细胞归巢和移植的基因如CXCR4的基因表达信号；通过细胞生存力检测，例如7-氨基放线菌素D(7-AAD)染色测定的干细胞和祖细胞生存力的无可测量的增加；和/或通过例如体外菌落形成单位(CFU-C)检测测定的干细胞自我更新的增加的能力。

[0285] 1.测定基因表达

[0286] 如本文所用，“基因表达”指在本发明治疗组合物中生物样品如干细胞和祖细胞或包含干细胞或祖细胞的细胞群中的基因如CXCR4的相对表达水平和/或表达谱。样品可包含异质或同质细胞群，并且可将来自样品的细胞群纯化或不进行纯化。可在cDNA、RNA、mRNA或其组合的水平上测量基因如CXCR4的表达。

[0287] 本领域可用于测定CXCR4基因表达的任何方法均包括在本文中。如本文所用，术语“检测表达”指测定基因的RNA转录物或其表达产物的量或存在。测定基因表达的方法包括基于PCR的方法、多核苷酸的杂交分析、基于多核苷酸测序的方法、免疫组织化学法和基于蛋白质组的方法。该方法通常检测目的基因的表达产物(如mRNA)。在一些实施方案中，使用了基于PCR的方法如反转录PCR(RT-PCR)(Weis et al.,TIG 8:263-64,1992)和基于阵列的方法如微阵列(Schena et al.,Science 270:467-70,1995)。

[0288] 提取RNA的一般方法为本领域所熟知，且公开在分子生物学的标准教科书中，包括Ausubel et al.,ed.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York 1987-1999。具体而言，可使用来自制造商如Qiagen(Valencia,Calif.)的纯化试剂盒、缓冲剂组(buffer set)和蛋白酶，根据厂商说明书进行RNA分离。例如，可使用Qiagen

RNeasy小型柱分离来自培养细胞的总RNA。分离的RNA可用于杂交或扩增检测，包括但不限于PCR分析和探针阵列。检测RNA水平的一种方法包括使分离的RNA和可与由所检测的基因编码的mRNA杂交的核酸分子(探针)接触。核酸探针可以为，例如，全长cDNA或其一部分，如至少7、15、30、60、100、250或500个核苷酸长度和足以在严格条件下与本发明的内在基因或任何DNA或RNA衍生物进行特异性杂交的寡核苷酸。mRNA与探针的杂交指示所检测的(in question)内在基因得到表达。

[0289] 测定样品中基因表达水平的替代性方法包括核酸扩增方法，例如，通过RT-PCR(美国专利第4,683,202号)、连接酶链式反应(Barany,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-93,1991)、自主序列复制(Guatelli et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-78,1990)、转录扩增系统(Kwoh et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-77,1989)、Q-β复制酶(Lizardi et al.,Bio/Technology 6:1197,1988)、滚环式复制(美国专利第5,854,033号)，或任何其他核酸扩增方法，然后使用本领域技术人员熟知的技术检测扩增分子。

[0290] 在本发明的具体方面，通过定量RT-PCR评估CXCR4基因表达。多种不同的PCR或QPCR方案为本领域已知，且在下文有例示，并且可以直接应用于或适用于将本文描述的组合物用于CXCR4的检测和/或定量的用途。定量PCR(QPCR)(也称为实时PCR)在一些情形下是优选的，因为其不仅提供了定量测量，还减少了时间和污染。在一些情形下，由于需要新鲜冷冻组织和专业的实验室设备，全长基因表达谱技术的可用性受到限制，这使得此类技术难以常规用于临床环境。如本文所用，“定量PCR(或“实时QPCR”)指直接监测PCR扩增进程，因为其发生不需要重复对反应产物取样。在定量PCR中，反应产物可通过信号转导机制(例如，荧光)进行监测，因为它们在信号上升至高于背景水平后但在反应达到稳定水平前被产生和跟踪。达到荧光的可检测的或“阈值”水平所需的循环数直接随可扩增靶标在PCR过程起始时的浓度变化，使得能够测量信号强度以提供样品中目标核酸量的实时测量。

[0291] “标准化”可用于消除样品之间的差异。对于微阵列数据，标准化过程旨在通过平衡两种标记染料的荧光强度来消除系统误差。染料偏差可来源于各种来源，包括染料标记效率、热和光敏感性以及扫描两种通道的扫描环境的差异。一些计算标准化因子的常用方法包括：(i)使用阵列上的所有基因的总体标准化，如通过强多阵列对数分析(RMA)；(ii)使用持续表达的看家/不变基因的看家基因标准化；以及(iii)使用杂交期间加入的已知量的外源对照基因的内部对照标准化(Quackenbush(2002)Nat.Genet.32(Suppl.),496-501)。在一个实施方案中，可通过将所述表达标准化为对照看家基因表达或通过进行强多阵列对数分析(RMA)测定本文公开的基因的表达。

[0292] 2.干细胞或祖细胞的基因表达谱

[0293] 所述治疗组合物包含具有与缺血性组织治疗相关的增加的治疗性能的处理的干细胞或祖细胞群。撇开任何具体理论的束缚，以前列腺素通路激动剂和/或糖皮质激素处理细胞，可赋予细胞对治疗缺血性组织或与缺血性组织相关的更多症状有用的增加的治疗性能。具有增加的治疗性能的细胞的特征在于，增加的CXCR4基因表达和CXCR4多肽的增加的细胞表面表达。在一个具体的实施方案中，所述治疗组合物包含的造血干细胞或祖细胞的特征在于，增加的基因和细胞表面CXCR4表达水平。

[0294] 以前列腺素通路激动剂和糖皮质激素处理的干细胞或祖细胞如造血干细胞或祖细胞可表征为，相比未处理细胞的CXCR4表达，CXCR4基因表达的至少增加为40、45、50、55、

60、65、70、75或80倍。

[0295] 具有增加的治疗性能的细胞还可表征为独特的基因表达信号，其中相比未处理的细胞，选自以下的1、2、3、4、5、6、7、8、9种或所有10种信号基因的表达增加：CXCR4、透明质酸合成酶1(HAS1)、GTP-结合蛋白GEM(GEM)、双特异性蛋白磷酸酶4(DUSP4)、双调蛋白(AREG)、核受体相关蛋白(NR4A2)、肾素(REN)、cAMP-响应元件调节物(CREM)、I型胶原α1链(COL1A1)和Fos-相关抗原2(FOSL2)。

[0296] 在其他具体的实施方案中，以前列腺素通路激动剂和糖皮质激素处理的造血干细胞或祖细胞具有基因表达信号，其中相比未处理的细胞，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种信号基因增加为至少40、45、50、55、60、65、70、75或80倍。在一些实施方案中，所有信号基因的平均倍数改变为至少约15、20、25、30或35倍。在一些实施方案中，所有信号基因的平均倍数改变为至少约25倍或30倍。

[0297] 处理的干细胞或祖细胞的基因表达或基因表达信号可在以试剂处理细胞后测定，或者可以在处理后、在测定细胞的基因表达信号前将细胞孵育一段时间。例如，可用一种或多种试剂在离体下处理细胞，洗涤去除该试剂，并且不进一步孵育细胞而分析基因表达。可选地，在一些实施方案中，以一种或多种试剂处理细胞，洗涤以从细胞群去除该试剂，然后将细胞在离体下孵育一段时间，再分析细胞的基因表达信号。

[0298] 3.HSPC来源

[0299] 以本发明方法制备的HSPC可获自任何合适的造血干细胞和祖细胞来源，并且可以作为高度纯化的HSPC群(同质群)或作为包含0.01％至约100％的HSPC(异质群)的组合物，来提供和处理。例如，并且非限制性地，HSPC可提供在组合物如未分级分离的骨髓(其中$CD34^+$细胞包含少于约1％的骨髓细胞群)、脐带血、胎盘血、胎盘、胎血、胎肝、胎脾、沃顿氏胶或动员的外周血中。

[0300] 可用于本发明方法的合适的HSPC来源包括但不限于，从包含造血来源细胞的身体器官分离或获得的细胞。“分离的”是指从其原始环境去除的材料。例如，如果细胞从在其天然状态下通常与其相伴的一些或所有组分中分离，则该细胞为分离的。例如，如本文所用，“分离的细胞群”、“分离的细胞源”或“分离的HSPC”等，指从它们的天然细胞环境，以及从与组织或器官的其他组分的结合中体外或离体分离一种或多种细胞，即其不再与体内物质大量结合。

[0301] HSPC可以获自或分离自成体骨髓，包括股骨、臀部、肋骨、胸骨和其他骨骼。可以使用针和注射器从臀部直接获取或分离含有HSPC的骨髓抽出物。其他HSPC来源包括脐带血、胎盘血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘、胎血、胎肝或胎脾。在具体的实施方案中，收获足够量的HSPC用于治疗应用可能需要动员供体中的干细胞和祖细胞。

[0302] “造血干细胞细胞动员”指从骨髓释放干细胞进入外周血环境，以用于干细胞移植前的白细胞去除。通过增加从供体收获的干细胞数，可以显著增加可用于治疗应用的干细胞数。造血生长因子如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或化疗剂常常被用于刺激所述动员。现有市售的干细胞动员药剂，并且可将其与G-CSF联用来动员足够量的造血干细胞和祖细胞，以用于移植至对象。例如，可将G-CSF和MozobilTM(Genzyme Corporation)给予至供体，以收获足够数目的造血细胞用于移植。动员造血干细胞和祖细胞的其他方法对本领域技术人员是显而易见的。

[0303] 在具体的实施方案中，HSPC获自脐带血。可以根据本领域已知的技术收获脐带血(参见，例如美国专利第7,147,626和7,131,958好，对于此类方法其通过引用并入本文)。

[0304] 在一个实施方案中，HSPC可获自多能(pluripotent)干细胞来源，例如诱导的多能干细胞(iPSC)和胚胎干细胞(ESC)。如本文所用，术语“诱导的多能干细胞”或“iPSC”指已重编程为多能态的非多能细胞。一旦对象的细胞重编程为多能态，细胞即可重编程为所需的细胞类型，如造血干细胞或祖细胞。如本文所用，术语“重编程”指增加细胞转化为较低分化态的潜能的方法。如本文所用，术语“编程”指减低细胞潜能或将细胞分化为较高分化态的方法。

[0305] 4.治疗性细胞组合物

[0306] 本发明还提供了包含本文所述的增强的HSPC的治疗组合物。具体而言，本发明的治疗组合物包含细胞群，所述细胞群包含HSPC，其中所述HSPC在离体下已与一种或多种能增加HSPC的CXCR4基因表达的试剂接触，并且其中相对于未接触的HSPC，HSPC的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。在一个实施方案中，本发明的治疗组合物包含细胞群，所述细胞群包含离体下以前列腺素通路激动剂和糖皮质激素处理的HSPC。在某些实施方案中，包含增强的HSPC的治疗组合物为全骨髓、脐带血或动员的外周血。

[0307] 在具体的实施方案中，所述治疗组合物包含细胞群，其中所述细胞群为约95％至约100％的HSPC。本发明部分包括，使用高度纯化的HSPC治疗组合物如包含细胞群的组合物(其中所述细胞包含约95％的HSPC)可以改善干细胞疗法的功效。本实施的移植方法通常使用未分级分离的细胞混合物，其中HSPC包括少于1％的总细胞群。

[0308] 在一些实施方案中，所述治疗组合物包含细胞群，其中所述细胞群包含少于约0.1％、0.5％、1％、2％、5％、10％、15％、20％、25％或30％的HSPC。一些实施方案中的细胞群包含少于约0.1％、0.5％、1％、2％、5％、10％、15％、20％、25％或30％的HSPC。在其他实施方案中，细胞群为约0.1％-约1％、约1％-约3％、约3％-约5％、约10％-约15％、约15％-20％、约20％-25％、约25％-30％、约30％-35％、约35％-40％、约40％-45％、约45％-50％、约60％-70％、约70％-80％、约80％-90％、约90％-95％或约95％-约100％的HSPC。

[0309] 在具体的实施方案中，细胞群为约0.1％-约1％、约1％-约3％、约3％-约5％、约10％-约15％、约15％-20％、约20％-25％、约25％-30％、约30％-35％、约35％-40％、约40％-45％、约45％-50％、约60％-70％、约70％-80％、约80％-90％、约90％-95％或约95％-约100％的HSPC。

[0310] 相对于被给予治疗组合物的对象，本发明治疗组合物的HSPC可为自体同源的/自体的(“自身的”)，或者为非自体同源的(“非自身的”，例如同种异体的、同基因的或异种的)。如本文所用的“自体同源的”指来自相同对象的细胞。如本文所用的“同种异体的”指与比较的细胞具有遗传差异的相同物种的细胞。如本文所用的“同基因的”指与比较的细胞遗传上相同的不同对象的细胞。如本文所用的“异种的”指比较的细胞物种不同的细胞。在具体的实施方案中，本发明的HSPC为同种异体的或自体的。

[0311] 可将用于本发明方法的HSPC去除来自骨髓抽出物、脐带血或动员的外周血(动员的白细胞去除产物)的成熟造血细胞如T细胞、B细胞、NK细胞、树状细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞及其定向前体细胞的细胞。将成熟、谱系定向的细胞通过免疫耗竭去除，例如，通过用结合以下一组所谓的“谱系”抗原的抗体来标记固体基质：CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、

CD16、CD19、CD56、CD123和CD235a。随后一步可进行细胞群的进一步纯化，其中以结合$CD34^+$抗原的抗体标记的基质被用于分离原始造血干细胞和祖细胞。可商购试剂盒用于从各种细胞来源纯化干细胞和祖细胞，并且在具体的实施方案中，这些试剂盒适合用于本发明的方法。用于纯化干细胞和祖细胞的示例性可商购试剂盒包括但不限于谱系(Lin)去除试剂盒(Miltenyi Biotec)；$CD34^+$富集试剂盒(Miltenyi Biotec)；RosettaSep(Stem Cell Technologies)。

[0312] 在一个实施方案中，所述治疗组合物中HSPC的量为至少0.1x 10^5个细胞、至少0.5x 10^5个细胞、至少1x 10^5个细胞、至少5x 10^5个细胞、至少10x 10^5个细胞、至少0.5x 10^6个细胞、至少0.75x 10^6个细胞、至少1x 10^6个细胞、至少1.25x 10^6个细胞、至少1.5x 10^6个细胞、至少1.75x 10^6个细胞、至少2x 10^6个细胞、至少2.5x 10^6个细胞、至少3x 10^6个细胞、至少4x 10^6个细胞、至少5x 10^6个细胞、至少10x 10^6个细胞、至少15x 10^6个细胞、至少20x 10^6个细胞、至少25x 10^6个细胞或至少30x 10^6个细胞。

[0313] 在一个具体的实施方案中，所述治疗组合物中HSPC的量为约0.1x10^5个细胞至约10x 10^5个细胞；约0.5x 10^6个细胞至约5x 10^6个细胞；约1x 10^6个细胞至约3x 10^6个细胞；约1.5x 10^6个细胞至约2.5x 10^6个细胞；或约2x 10^6个细胞至约2.5x 10^6个细胞。

[0314] 在一个具体的实施方案中，所述治疗组合物中HSPC的量为约1x 10^6个细胞至约3x 10^6个细胞；约1.0x 10^6个细胞至约5x 10^6个细胞；约1.0x 10^6个细胞至约10x 10^6个细胞、约10x 10^6个细胞至约20x 10^6个细胞、约10x 10^6个细胞至约30x 10^6个细胞或约20x 10^6个细胞至约30x 10^6个细胞。

[0315] 在另一实施方案中，所述治疗组合中HSPC的量为约1x 10^6个细胞至约30x 10^6个细胞；约1.0x 10^6个细胞至约20x 10^6个细胞；约1.0x 10^6个细胞至约10x 10^6个细胞、约2.0x 10^6个细胞至约30x 10^6个细胞、约2.0x 10^6个细胞至约20x 10^6个细胞，或约2.0x 10^6个细胞至约10x 10^6个细胞。

[0316] 在一个具体的实施方案中，所述治疗组合物中HSPC的量为约1x 10^6个HSPC、约2x 10^6个细胞、约5x 10^6个细胞、约7x 10^6个细胞、约10x 10^6个细胞、约15x 10^6个细胞、约17x 10^6个细胞、约20x 10^6个细胞、约25x 10^6个细胞或约30x 10^6个细胞。

[0317] 在一个实施方案中，所述治疗组合物中HSPC的量为部分或单个脐带的血中HSPC的量，或为至少0.1x 10^5细胞/kg体重、至少0.5x 10^5个细胞/kg体重、至少1x 10^5个细胞/kg体重、至少5x 10^5个细胞/kg体重、至少10x 10^5个细胞/kg体重、至少0.5x 10^6个细胞/kg体重、至少0.75x10^6个细胞/kg体重、至少1x 10^6个细胞/kg体重、至少1.25x 10^6个细胞/kg体重，至少1.5x 10^6个细胞/kg体重、至少1.75x 10^6个细胞/kg体重、至少2x 10^6个细胞/kg体重、至少2.5x 10^6个细胞/kg体重、至少3x 10^6个细胞/kg体重、至少4x 10^6个细胞/kg体重、至少5x 10^6个细胞/kg体重、至少10x 10^6个细胞/kg体重、至少15x 10^6个细胞/kg体重、至少20x 10^6个细胞/kg体重、至少25x 10^6个细胞/kg体重或至少30x 10^6个细胞/kg体重。

[0318] D.制备本发明的增强的细胞的方法

[0319] 本发明部分包括制备特征为增加的CXCR4基因表达水平的HSPC的方法。在一个具体的实施方案中，制备HSPC的方法包括，在足以将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，在离体下以一种或多种能够增加被接触的细胞的CXCR4基因表达的试剂处理HSPC。在一个实施方案中，制备本发明HSPC的方法包括

在离体下以前列腺素通路激动剂和糖皮质激素处理HSPC。

[0320] 如本文所用，术语“足以…的条件”或“在足以…的条件下”指相比对照、媒介物或未处理的细胞，以一种或多种试剂处理HSPC来将细胞的CXCR4基因表达增加到令人惊奇的和预料不到的水平的条件。

[0321] 条件包括但不限于细胞来源、用于处理细胞的试剂和试剂浓度、细胞暴露于试剂的时间以及处理温度。

[0322] 1.可用于制备增强的细胞的试剂

[0323] 如本文所用，“试剂”指能增加用试剂处理的HSPC的CXCR4基因表达的化合物或分子，且指单独或联合另外的化合物或分子使用时能增加CXCR4表达的化合物。在本发明的具体的实施方案中，能协同作用来增加用组合物处理的HSPC的CXCR4基因表达的两种或更多种试剂的组合被用于制备增强的HSPC。具体的试剂包括，例如能刺激前列腺素通路的化合物，如前列腺素通路激动剂以及糖皮质激素。

[0324] 2.前列腺素通路激动剂

[0325] 如本文所用，术语“前列腺素通路激动剂”指能刺激前列腺素细胞信号转导通路的试剂，包括能刺激PGE_2R_2和/或PGE_2R_4细胞信号转导通路并增加细胞的CXCR4基因表达的试剂。适合用于制备本发明细胞的前列腺素通路激动剂的示例性实例包括但不限于：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2、8-异-16-环己基-四去甲PGE_2和PGE_2类似物。在某些实施方案中，PGE_2R_2和PGE_2R_4激动剂及其类似物尤其让人感兴趣，并且在一些实施方案中，所述试剂优先结合和激活PGE_2 EP_2或PGE_2EP_4受体。

[0326] 如本文所用，术语“前列腺素E_2”或“PGE_2”包括但不限于任何天然存在的或化学合成的PGE_2分子及其“类似物”。如本文所用，术语“类似物”涉及这样的化学分子，其与另外的化学物质如PGE_2在结构和功能上类似，结构差异常常为单个元件或基团，但如果其保留了与亲本化合物相同的功能，差异可以为多于1个基团(例如2、3或4个基团)的修饰。此类修饰是本领域的常规操作，并且包括，例如添加或取代的化学基团，如酸的酯和酰胺，醇或硫醇的保护基团如苄基，以及胺的叔丁氧羰基。还包括对烷基侧链如烷基取代基(如甲基、二甲基、乙基等)的修饰，将侧链修饰为饱和或不饱和水平，以及添加修饰的基团如取代的苯基和苯氧基。类似物还可以包括缀合物如生物素或亲和素基团、酶如辣根过氧化物酶等，并且包括放射性标记的、生物性发光的、化学发光的或荧光基团。另外，可以将基团加入至本文所述的试剂，以改变其药代动力学性能，如增加体内或离体半衰期，或增加其细胞渗透性能以及其他所需的性能。还包括前药，已知其能增加药物的众多所需的特性(例如溶解度、生物利用度、生产等)(参见，例如WO/2006/047476的示例性EP激动剂前药，对于此类激动剂的公开其通过引用并入本文)。

[0327] PGE_2“类似物”的示例性实例包括但不限于：16,16-二甲基PGE_2(“$dmPGE_2$”)、16,16-二甲基PGE_2对-(对-乙酰胺苯甲酰氨基)苯酯、11-脱氧-16,16-二甲基PGE_2、9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE_2、9-脱氧-9-亚甲基PGE_2、9-酮氟前列醇、5-反式PGE_2、17-苯基-ω-三去甲PGE_2、PGE_2丝氨醇酰胺，PGE_2甲酯、16-苯基四去甲PGE_2、15(S)-15-甲基PGE_2、15(R)-15-甲基PGE_2、8-异-15-酮PGE_2、8-异PGE_2异丙酯、8-异-16-环己基-四去甲PGE_2、20-羟基PGE_2、20-乙基PGE_2、11-脱氧PGE_1、诺氯前列素、硫前列酮、布他前列素、15-酮PGE_2和19(R)羟基PGE_2。还包括与在9-位置用卤素取代的PGE_2具有类似结构的PG类似物或衍生物(参见，例如

WO 2001/12596，其通过引用整体并入本文中)，以及2-脱羧基-2-磷酸亚基前列腺素衍生物，如美国公布第2006/0247214号中描述的那些，其通过引用整体并入本文中)。

[0328] PGE_1类似物包括但不限于前列地尔，其还可用于激活PGE_2R_2(EP_2)和PGE_2R_4(EP_4)细胞信号转导通路，并且作为可用于本发明方法的试剂包括在本文中。

[0329] PGE_2R_2(EP_2)和PGE_2R_4(EP_4)细胞信号转导通路的刺激/激活包括在本文中，以作为HSPC中增加移植、维持细胞生存力以及增加细胞归巢和增殖的生理反应的基础。因此，在一个实施方案中，结合并刺激PGE_2R_2和PGE_2R_4受体的“非基于PGE_2的配体”(即PGE_2R_2/PGE_2R_4激动剂)包括在本文中，用于本发明的方法。

[0330] 非基于PGE_2的EP_2受体激动剂的示例性实例包括，WO 2007/071456中公开的CAY10399、ONO_8815Ly、ONO-AE1-259、CP-533,536和咔唑及芴。

[0331] 非基于PGE_2的EP_4激动剂的示例性实例包括，WO/2000/038663、美国专利第6,747,037号和美国专利第6,610,719号中公开的ONO-4819、APS-999Na、AH23848、ONO-AE1-329和其他非基于PGE_2的EP_4激动剂。

[0332] PGE_2 EP_4受体选择性的试剂优先结合并激活PGE_2 EP_4受体。此类试剂对EP_4受体比对其他3种EP受体即EP_1、EP_2和EP_3中的任一种具有更好的亲和力。选择性结合PGE EP_4受体的试剂包括但不限于，选自以下的试剂：5-[(1E,3R)-4,4-二氟-3-羟基-4-苯基-1-丁烯-1-基]-1-[6-(2H-四唑-5R-基)己基]-2-吡咯烷酮；2-[3-[(1R,2S,3R)-3-羟基-2-[(E,3S)-3-羟基-5-[2-(甲氧基甲基)苯基]戊-1-烯基]-5-氧代环戊基]磺酰基丙基磺酰基]乙酸；4-[2-[(1R,2R,3R)-3-羟基-2-[(E,3S)-3-羟基-4-[3-(甲氧基甲基)苯基]丁-1-烯基]-5-氧代环戊基]乙基磺酰基]丁酸甲酯；16-(3-甲氧基甲基)苯基-ro-四去甲-5-噻PGE；5-{3-[(2S)-2-{(3R)-3-羟基-4-[3-(三氟甲基)苯基]丁基}-5-氧代吡啶烷-1-基]丙基]噻吩-2-羧酸酯；[4'-[3-丁基-5-氧代-1-(2-三氟甲基-苯基)-1,5-二氢-[1,2,4三唑-4-基甲基]-二苯基-2-磺酸(3-甲基-噻吩-2-羰基)-胺]；和((Z)-7-{(1R,4S,5R)-5-[(E)-5-(3-氯代-苯并[b]噻吩-2-基)-3-羟基-戊-1-烯基]-4-羟基-3,3-二甲基-2-氧代-环戊基}-庚-5-烯酸)，以及任何这些试剂的药学可接受的盐。

[0333] 在具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂为PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2或8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0334] 3.糖皮质激素

[0335] 适合用于本发明方法的糖皮质激素和糖皮质激素受体激动剂的示例性实例包括但不限于：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合

物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索以及它们的组合。

[0336] 在具体的实施方案中，糖皮质激素包括甲羟松、氢化可的松、去炎松、阿氯米松或地塞米松。在更具体的实施方案中，糖皮质激素为甲羟松。

[0337] 4.试剂组合

[0338] 试剂组合也可用于制备本发明的增强的HSPC，并且在具体的实施方案中，以试剂组合处理HSPC引起处理细胞的CXCR4基因和蛋白表达的出人意料的协同增加。具体而言，以前列腺素通路激动剂和糖皮质激素组合处理的HSPC展现出CXCR4基因和蛋白表达的出人意料的高增加，并且这与处理的细胞相比对照、媒介物或未处理细胞的改善的治疗性能相关。

[0339] 在本发明的具体实施方案中，用一种或多种前列腺素通路激动剂和一种或多种糖皮质激素的组合处理HSPC。

[0340] 在本发明的具体实施方案中，在所述组合中的前列腺素通路激动剂为选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。在本发明的其他实施方案中，前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或其衍生物。在具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂为PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2或8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。在本发明的更具体的实施方案中，前列腺素通路激动剂为PGE_2或16,16-二甲基PGE_2。

[0341] 在一些实施方案中，所述组合中的糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0342] 在更具体的实施方案中，所述组合中的糖皮质激素包括，甲羟松、氢化可的松、阿氯米松、地塞米松、甲基泼尼松龙或去炎松。在一个实施方案中，糖皮质激素为甲羟松。

[0343] 在一些实施方案中，用包含选自以下的前列腺素通路激动剂与一种或多种糖皮质激素的组合处理HSPC：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。在一个具体的实施方案中，用包含PGE_2或$dmPGE_2$与糖皮质激素的组合处理HSPC。

[0344] 在一些实施方案中，用包含选自PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2的前列腺素通路激动剂，与选自甲羟松、氢化可的松、阿氯米松、地塞米松、甲基泼尼松龙或去炎松的糖皮质激素的组合处理HSPC。

[0345] 在其他实施方案中，所述组合包含PGE_2或$dmPGE_2$与甲羟松、氢化可的松、阿氯米松、地塞米松、甲基泼尼松龙或去炎松。在更具体的实施方案中，用包含PGE_2或$dmPGE_2$与甲羟松

的组合处理HSPC。

[0346] 5.试剂配制

[0347] 采用cGMP方法，可将可用于制备本发明治疗组合物的试剂配制在有机溶剂如乙酸甲酯中，以用于接触本发明的细胞，并且可以在无内毒素的容器中提供。本发明包括的试剂适于在离体下给予至哺乳动物细胞，如本文所述。在某些实施方案中，所述溶剂通常为合适的有机溶剂，如本文所述(例如，DMSO、DMF、DME等，包括它们的组合或混合物)。可按一定的比例组合一种或多种试剂。例如，可按9.5:0.5、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5等(包括所有整数和小数)的比例组合两种试剂的混合物。

[0348] 表述“有机溶剂”或“合适的有机溶剂”通常涉及含有能溶解固态、液态或气态溶质而产生溶液的含碳液体或气体。“合适的”有机溶剂为适于离体给药或与哺乳动物细胞一起孵育的溶剂，并还可能适于体内给予至对象，如在孵育或给药时期通过在离体条件(例如，细胞培养)下或在体内、于选定浓度具有最小的毒性或其他抑制作用。合适的有机溶剂还应当适合储存稳定性和处理本文描述的试剂。合适的有机溶剂的实例包括但不限于：二甲亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲氧基乙烷(DME)和二甲基乙酰胺，包括它们的混合物和组合。在某些实施方案中，组合物或有机溶剂为“基本上无”乙酸甲酯的，意指组合物或溶剂中应当无多于痕量的乙酸甲酯，并且优选地无可检测量的乙酸甲酯(例如，如通过高效液相色谱(HPLC)、气象色谱(GC)等测得的)。

[0349] 如本文所用，术语“无内毒素的”指容器和/或组合物含有至多痕量(即对于对象没有不利生理效应的量)的内毒素，并且优选地含有检测不到的量的内毒素。“基本上无内毒素”是指每剂量的细胞存在比FDA针对生物允许的量更少的内毒素，所述量为每天5EU/kg体重的总内毒素，其对平均为70kg人来说为每细胞总剂量350EU。在一个实施方案中，术语“无内毒素的”指容器和/或组合物至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％无内毒素。内毒素是与某些细菌，通常是革兰氏阴性菌相关的毒素，尽管内毒素可以发现于革兰氏阳性菌如李斯特菌(Listeria monocytogenes)中。最普遍的内毒素为各种革兰氏阴性细菌外膜中发现的脂多糖(LPS)或脂寡糖(LOS)，并且其在这些细菌的致病能力中代表了主要的致病性。人体中小量的内毒素可引起发烧、血压降低和炎症和凝集激活，以及其他不利的生理效应。因此，通常可取的是，从药物产品的容器中去除大多数或所有的痕量内毒素，因为即使小量也能在人体中引起不利的效应。可使用本领域已知的方法从容器中去除内毒素，例如，容器可在HEPA过滤洗涤设备中用无内毒素的水进行清洁，在250℃去热原，并在位于100/10级无尘室(例如100级无尘室，1立方英寸空气中含有不多于100个大于半微米的颗粒)内的HEPA过滤工作站中清洁包装。

[0350] 在具体实施方案中，用一种或多种试剂处理(例如，接触)HSPC，每种试剂的终浓度为约1μM至约100μM。在某些实施方案中，用一种或多种试剂处理HSPC，每种试剂的终浓度为约1x 10^{-14}M至约1x 10^{-3}M、约1x 10^{-13}M至约1x 10^{-4}M、约1x 10^{-12}M至约1x 10^{-5}M、约1x 10^{-11}M至约1x 10^{-4}M、约1x 10^{-11}M至约1x 10^{-5}M、约1x 10^{-10}M至约1x10^{-4}M、约1x 10^{-10}M至约1x 10^{-5}M、约1x 10^{-9}M至约1x 10^{-4}M、约1x 10^{-9}M至约1x 10^{-5}M、约1x 10^{-8}M至约1x 10^{-4}M、约1x 10^{-7}M至约1x 10^{-4}M、约1x 10^{-6}M至约1x 10^{-4}M，或者任何介于中间范围的终浓度。

[0351] 在另一具体的实施方案中，用一种或多种试剂处理HSPC，每种试剂的终浓度为约1x 10^{-14}M、约1x 10^{-13}M、约1x 10^{-12}M、约1x 10^{-10}M、约1x 10^{-9}M、约1x 10^{-8}M、约1x 10^{-7}M-约1x

10^{-6}M、约1x 10^{-5}M、约1x 10^{-4}M、约1x 10^{-3}M，或者任何介于中间范围的终浓度。在包含一种或多种试剂的处理中，试剂可为彼此不同的浓度，或可为相同的浓度。

[0352] 在具体的实施方案中，将HSPC处理(例如，用一种或多种试剂接触)1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次或更多次。可在相同容器中用一种或多种试剂间歇、分段或连续接触HSPC(例如，使细胞群与一种药物接触一段时间，交换培养基和/或洗涤细胞群，然后用相同的或不同的药剂组合重复该循环相同的预定时间段或不同的预定时间段)。

[0353] 6.HSPC的处理

[0354] 在一个实施方案中，制备HSPC的方法包括在足以将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，在离体下以一种或多种能增加被接触的细胞CXCR4基因表达的试剂处理HSPC。HSPC可在从对象分离后用本文公开的试剂进行处理。在另一实施方案中，在用本文公开的试剂处理前，将HSPC从对象分离并扩增。在一个实施方案中，在用本文公开的试剂处理前，从对象分离HSPC并冷冻保藏。

[0355] 在具体的实施方案中，以能将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的有效量和足够时间(即足够的条件)，用一种或多种试剂如前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合处理HSPC。

[0356] 在各种实施方案中，足够的温度条件包括在生理相关温度，如约22℃至约39℃(约室温至约体温)的温度范围，包括但不限于约22℃、23℃、24℃、25℃、26℃，27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃和39℃的温度下，用一种或多种试剂孵育HSPC。在一个具体的实施方案中，足够的温度条件为约35℃至39℃。在一个实施方案中，足够的温度条件为约37℃。

[0357] 在各种实施方案中，足够的试剂浓度为终浓度约10nM至约100μM、约100nM、约500nM、约1μM、约10μM、约20μM、约30μM、约40μM、约50μM、约60μM、约70μM、约80μM、约90μM、约100μM、约110μM或约120μM，或试剂的其他介于中间的任何浓度(例如，1μM、1μM、5μM、10μM、20μM、50μM、100μM)。在具体的实施方案中，每种试剂的足够浓度为约10μM至约25μM的终浓度。在一个实施方案中，试剂的足够浓度为约10μM的终浓度。

[0358] 在各种实施方案中，用一种或多种试剂处理HSPC的足够时间段为约60分钟至约24小时、约60分钟至约12小时、约60分钟至约6小时、约2小时至约6小时、约2小时至约4小时的孵育时间段，并且包括但不限于约60分钟、约70分钟、约80分钟、约90分钟、约100分钟、约110分钟、约2小时、约2.5小时、约3小时、约3.5小时或约4小时的持续时间，或任何其他的中间持续时间的处理。在一个具体的实施方案中，足够的孵育时间段为约2小时至约4小时。在一个实施方案中，处理HSPC的足够的孵育时间段为约4小时。

[0359] 在具体的实施方案中，足以将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的条件，包括在离体下于约22℃至约39℃的温度范围；以约10μM至约25μM终浓度的前列腺素通路激动剂，和约10μM至约25μM的糖皮质激素；以及用所述试剂孵育约1小时至约4小时、约2小时至约3小时、约2小时至约4小时或约3小时至约4小时来处理HSPC。

[0360] 在具体的实施方案中，足以将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的条件，包括在离体下于约22℃至约39℃的温度范围；以约10μM至约25μM终浓度的PGE_2或$dmPGE_2$，和约10μM至约25μM的糖皮质激素；以及用所述试剂孵

育约1小时至约4小时、约2小时至约3小时、约2小时至约4小时或约3小时至约4小时来处理HSPC。

[0361] 在具体的实施方案中，足以将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的条件，包括在离体下于约22℃至约39℃的温度范围；以约10μM至约25μM终浓度的PGE_2或$dmPGE_2$，和约10μM至约25μM的选自甲羟松、氢化可的松、阿氯米松、地塞米松、甲基泼尼松龙或去炎松的化合物；以及用所述试剂(化合物)孵育约1小时至约4小时、约2小时至约3小时、约2小时至约4小时或约3小时至约4小时来处理HSPC。

[0362] 在具体的实施方案中，足以将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的条件，包括在离体下于约22℃至约39℃的温度范围；以约10μM至约25μM终浓度的前列腺素通路激动剂，和约10μM至约25μM的甲羟松；以及用所述试剂孵育约1小时至约4小时、约2小时至约3小时、约2小时至约4小时或约3小时至约4小时来处理HSPC。

[0363] 在另一实施方案中，足以将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的条件，包括在离体下于约37℃(约体温)的温度孵育；以约10μM终浓度的PGE_2或16,16-二甲基PGE_2，结合约10μM终浓度的选自甲羟松、氢化可的松、阿氯米松、地塞米松、甲基泼尼松龙或去炎松的化合物；以及孵育约4小时来处理HSPC。

[0364] 在另一实施方案中，足以将接触的细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的至少30、40、50、60、70或80倍的条件，包括在离体下于约37℃(约体温)的温度孵育；以约10μM终浓度的PGE_2或16,16-二甲基PGE_2，结合约10μM终浓度的甲羟松；以及孵育约4小时来处理HSPC。

[0365] 在具体的实施方案中，将HSPC处理(例如，与一种或多种试剂接触)1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次或更多次。可在相同容器中用一种或多种试剂间歇、分段或连续接触细胞(例如，使HSPC与一种药物接触一段时间，交换培养基和/或洗涤细胞群，然后用相同的或不同的药剂组合重复该循环相同的预定时间段或不同的预定时间段)。

[0366] E.增强的干细胞的治疗应用

[0367] 本文描述的HSPC具有增加的CXCR4基因和蛋白表达，并且相比未处理的细胞还展现增强的治疗性能。具体而言，本发明的HSPC展现增加的归巢至骨髓、缺血性组织位点和缺血损坏的组织，并且还展现增加的移植。因此，本发明的HSPC可用于治疗需要治疗的对象，所述治疗能增加HSPC归巢和/或移植至骨髓或缺血位点或缺血损坏的组织。在某些实施方案中，通过细胞补充、增加缺血组织的血管形成、增加缺血位点的组织再生、降低缺血性组织坏死活细胞凋亡，和/或增加缺血位点的细胞存活，HSPC还可用于改善造血干细胞移植和治疗缺血或缺血损坏的组织，以及降低缺血性组织的进一步损伤和/或修复缺血性组织损伤。在具体的实施方案中，HPSC可用于需要造血细胞重建的对象，如已接受或预期将接受清髓疗法的对象。

[0368] 如本文所用，术语“移植(engraft)”指细胞融入某一位置如组织并长时间保持在该特定位置的能力。细胞可以移植在例如骨髓，或移植在另一位点如受伤位点或缺血组织。“归巢”指HSPC定位即移动至特定区域或组织的能力。归巢可以包括将给予的HSPC定位至骨髓或另一位点如受损或缺血组织的位点。在一个实施方案中，细胞使用化学引诱剂机制归巢至特定组织：具有增加的CXCR4表达的细胞具有改善的至分泌基质细胞衍生因子1(SDF1)

(CXCR4的同源配体)的缺血组织的归巢。

[0369] 如本文所用,“对象”包括任何展现能够用本发明的基于细胞的组合物治疗,或可以用具有增加的CXCR4基因表达的HSPC治疗的症状的人。

[0370] 在不同的其他实施方案中,本发明提供了治疗有需要的对象的方法,包括鉴定有需要的对象,并在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下,将与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂(包括前列腺素通路激动剂和糖皮质激素的组合)接触的HSPC给予至对象,从而治疗有需要的对象。

[0371] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等指得到期望的药理学和/或生理效应,包括但不限于实现疾病症状的改善或消除。效应可以是预防性的,表现为完全或部分预防疾病或其症状,和/或可以为治疗性的,表现为实现症状的改善或消除,或者提供对该疾病引起的疾病和/或不利效应的部分或完全治愈。如本文所用,“治疗”包括哺乳动物尤其是人的疾病的任何治疗,并且包括:(a)在可能易患病但还未诊断为患有疾病的对象中防止疾病发生;(b)抑制疾病,即阻止其发展;(c)缓解疾病,如造成疾病消退,例如,以完全或部分消除疾病症状;以及(d)使个体恢复到疾病前状态,例如重建造血系统。

[0372] 如本文所用,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”包括对疾病或病理状态的症状或病理的任何期望效应,并且可以包括受治疗疾病或病症的一种或多种可测量标记的甚至最小的减少。“治疗”不一定显示或要求疾病或病症或者其相关症状的完全消除或治愈。

[0373] 1.干细胞移植方法

[0374] 对造血细胞重建、造血系统重建和增加的HSPC数目“有需要的对象”,包括但不限于本文其他地方讨论的患有或诊断为患有各种类型的白血病、贫血、淋巴瘤、骨髓瘤、免疫缺陷病患和实体瘤的对象。“对象”还包括干细胞移植或骨髓移植的候选人,如在恶性病治疗过程或基因治疗组成中。在具体的实施方案中,对象接受了基因改造的HSPC作为基于细胞的基因治疗。对象还可以包括捐赠干细胞活骨髓用于同种异体移植的个体或动物。在某些实施方案中,对象可能接受了清髓性放射治疗或化疗,或者可能经历了造成骨髓抑制(myeloablation)的急性辐射或化学损伤(insult)。在某些实施方案中,对象可能经历了放射治疗或化疗,如在各种癌症治疗期间。典型的对象包括展现异常量(比“正常”或“健康”对象更低或更高的量)的可通过试剂或干细胞或骨髓移植调节的一种或多种生理活性的动物。

[0375] 需要造血细胞重建的对象包括接受了癌症的化疗或放射治疗的对象,以及患有(例如,害有)非恶性血液病,特别是免疫缺陷病(例如SCID、范科尼氏贫血症、严重型再生不良性贫血或先天性血红蛋白病,或代谢贮积病如赫尔勒氏病、亨特氏病(Hunter’s disease)、甘露糖苷贮积症等)或癌症,特别是恶性血液病如急性白血病、慢性白血病(骨髓或淋巴)、淋巴瘤(霍奇金或非霍奇金)、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征或非血液性癌症如实体瘤(包括乳腺癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、皮肤癌、肝癌或胰腺癌)的对象。

[0376] 对象还可以包括患有再生障碍性贫血、免疫病(严重组合型免疫缺陷综合征或狼疮)、脊髓发育不良、地中海贫血、镰状细胞病或威斯科特-奥尔德里奇综合征的对象。在一

些实施方案中，对象患有的病患起因于另一初级治疗如放射治疗、化疗，或者采用骨髓抑制性药物如齐多夫定、氯霉素或更昔洛韦的治疗的不良副作用或并发症。此类病患包括中性粒细胞减少、贫血、血小板减少和免疫紊乱。

[0377] 其他对象可能患有造成骨髓干细胞或祖细胞损伤的感染(例如，病毒感染、细菌感染或真菌感染)引起的病患。

[0378] 另外，患有以下病症的对象也可以从使用本发明HSPC的治疗获益：淋巴细胞减少症、淋巴溢(lymphorrhea)、淋巴淤滞、红细胞减少、红细胞退化性疾病(erthrodegenerative disorder)、成红细胞减少症(erythroblastopenia)、成白红细胞增多病；红血球破碎、地中海贫血、骨髓纤维化、血小板减少、弥散性血管内凝血(DIC)、免疫(自身免疫)血小板减少性紫癜(ITP)、HIV引起的ITP、脊髓发育不良；血小板增多性疾病(thrombocytotic disease)、血小板增多、先天性中性粒细胞减少(如柯士文症候群(Kostmann's syndrome)和Schwachman-Diamond综合征)、瘤相关性中性粒细胞减少、儿童及成人循环性中性粒细胞减少症；感染后中性粒细胞减少症；骨髓异常增生综合征；与化疗和放疗相关的中性粒细胞减少症；慢性肉芽肿性疾病；黏多醣症；Diamond Blackfan贫血；镰状细胞疾病；或β重型地中海贫血。

[0379] 在一个具体的实施方案中，对象为已捐赠骨髓的骨髓供体、为尚未捐赠骨髓的骨髓供体、为骨髓供体移植受体、具有置于环境压力下的造血祖细胞、患有贫血、具有相比正常对象的降低的免疫细胞功能，或具有免疫系统缺陷。

[0380] 在某些实施方案中，对象患有骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性髓系白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性非淋巴细胞性白血病或前白血病。

[0381] 在具体的实施方案中，对象需要基因治疗，如血红蛋白病。如本文所用，术语“血红蛋白病”或“血红蛋白性病症”包括与血液中存在异常血红蛋白分子相关的任何病患。血红蛋白病的实例包括但不限于，血红蛋白C疾病、血红蛋白镰状细胞疾病(SCD)、镰状细胞贫血和地中海贫血。还包括其中血液中存在组合的异常血红蛋白(例如，镰状细胞/Hb-C疾病)的血红蛋白病。

[0382] 术语“镰状细胞贫血”或“镰状细胞疾病”在本文中定义为包括任何有症状的贫血病症，其起因于红细胞的镰状化。镰状细胞疾病的临床表现包括：贫血；疼痛；和/或器官功能障碍如肾衰竭、视网膜病、急性胸部综合征、局部缺血、阴茎持续勃起和中风。如本文所用，术语“镰状细胞疾病”指镰状细胞贫血后出现的多种临床问题，尤其是在HbS中镰状细胞替代为纯合体的那些对象中。本文通过使用术语镰状细胞疾病提及的构成性临床表现包括生长和发育延迟、增加的发展严重感染的倾向(特别是肺炎球菌引起的)、显著的脾功能损伤、阻止循环细菌的有效清除以及脾组织的反复梗塞和最终破坏。术语“镰状细胞疾病”还包括肌肉骨骼痛的急性发作，其首先影响腰椎、腹部和股骨干，且其在机制和严重性上类似于减压病。在成体中，此类发作通常表现为每几周或几月短期的轻微或中等的发作，夹杂着平均约每年发作一次的持续5-7天的痛苦发作。已知的可引发此类危险的事件包括酸中毒、组织缺氧和脱水，它们均增强HbS的胞内聚合(J.H.Jandl,Blood:Textbook of Hematology,2nd Ed.,Little,Brown and Company,Boston,1996,第544-545页)。如本文所用，术语“地中海贫血”包括由于影响血红蛋白合成的突变而产生的遗传性贫血。因此，该术

语包括地中海贫血病症引起的任何有症状的贫血，如严重的或β-地中海贫血、重型地中海贫血、中型地中海贫血、α-地中海贫血如血红蛋白H疾病。

[0383] 如本文所用，“地中海贫血”指遗传性病患，其特征为血红蛋白产生缺陷。地中海贫血的实例包括，β和a地中海贫血，β地中海贫血由β球蛋白链突变引起，并且可以重型或轻型形式发生。在重型形式的β地中海贫血中，儿童生下来是正常的，但在生命的第一年中发展为贫血。轻型形式的β地中海贫血产生小的红细胞，地中海贫血由从球蛋白链缺失一个或多个基因引起。如本所用，“抗镰状化蛋白”包括防止或逆转引起镰状细胞病症中红细胞镰状化的病理事件的蛋白。在本发明的一个实施方案中，本发明的转导的细胞被用于将抗镰状化蛋白递送至患有血红素疾病的对象。抗镰状化蛋白还包括成熟的β-球蛋白基因，其包含抗镰状化氨基酸残基。

[0384] 在各种实施方案中，本发明部分提供了获取和制备用于造血干细胞/祖细胞移植的HSPC的方法，包括在足以将HSPC的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，使HSPC与能增加HSPC的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合接触。

[0385] 在不同的其他实施方案中，本发明部分提供了增加对象中的造血干细胞和祖细胞归巢的方法，包括在足以将HSPC的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，使HSPC与能增加HSPC的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合接触。

[0386] 在具体的实施方案中，洗涤处理的HSPC以基本上去除试剂，并随后给予至需要增加造血干细胞归巢的对象。

[0387] 本发明部分包括增加有需要的对象中的干细胞移植的方法，包括在足以将HSPC的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，使包含HSPC(例如，骨髓细胞、外周血细胞和/或脐带血细胞)的细胞群与能增加HSPC的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合接触，以及将增强的HSPC给予至对象。

[0388] 在一个具体的实施方案中，本发明提供了治疗需要造血细胞重建或造血系统重建的对象的方法，包括确定需要造血细胞重建的对象，以及将一定量的HSPC给予至所述对象，所述HSPC在足以将HSPC的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加HSPC的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触，从而治疗需要造血细胞重建的对象。

[0389] 在另一个具体的实施方案中，本发明提供了治疗需要造血细胞重建、造血系统重建或增加HSPC数目的对象的方法，包括确定需要造血细胞重建的对象，以及将一定量的HSPC给予至所述对象，所述HSPC在足以将HSPC的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加HSPC的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触，从而治疗需要造血细胞重建的对象。

[0390] 在另一具体的实施方案中，本发明包括治疗需要造血干细胞移植的对象的方法，包括：挑选需要造血干细胞移植的对象，以及将HSPC给予至对象，所述HSPC在足以将HSPC的

CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加HSPC的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。在具体的实施方案中，所述对象需要造血细胞重建。

[0391] 在本文公开的用于增加HSPC归巢或移植，或者用于治疗需要造血细胞重建、造血系统重建的对象或者用于进行造血干细胞移植的方法的具体示例性实施方案中，用一种或多种试剂的组合处理HSPC，所述试剂包括(i)PGE_2、dmPGE_2、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2或8-异-16-环己基-四去甲PGE_2，和(ii)糖皮质激素。在更具体实施方案中，所述组合包括(i)PGE_2或16,16-二甲基PGE_2，与(ii)甲羟松、氢化可的松、地塞米松、甲基泼尼松龙、去炎松或阿氯米松。在更具体实施方案中，所述组合包括(i)PGE_2或16,16-二甲基PGE_2与(ii)甲羟松。

[0392] 撇开任何具体理论的束缚，本发明部分包括，使用本发明的增强的HSPC在干细胞移植中的一个优势为在移植中可使用较少的HSPC，因为增强的HSPC例如，相比未处理的HSPC，具有增加的移植潜能、改善的归巢和增加的体内扩增能力。

[0393] 2.缺血性组织治疗方法

[0394] 本发明提供了基于细胞的治疗用于治疗缺血性组织或者治疗或改善一种或多种与组织缺血相关的症状，包括但不限于，器官功能的受损或丧失(包括但不限于，脑、肾或心脏功能的受损或丧失)、痉挛、跛行、麻痹、刺痛、虚弱、疼痛、降低的伤口愈合、炎症、皮肤色素减退和坏疽的方法。

[0395] 可以通过增加的干细胞归巢至缺血性组织损伤位点、缺血性组织位点处增加的内源干细胞和内皮祖细胞补充、缺血性组织位点处增加的血管形成、减少的缺血性组织坏死或程序性细胞死亡，或者缺血性组织位点处增加的细胞存活，来治疗缺血性组织。因此，本发明部分包括，具有这些治疗性能的细胞可用于治疗缺血性组织或因缺血损坏的组织，或者治疗或改善与缺血性组织相关的至少一种症状。

[0396] 如本文所用，术语“局部缺血”、“缺血性病症”或“缺血性事件”指脉管系统的任何收缩、损伤或阻碍造成的供应至任何细胞、组织、器官或身体部分的血液的任何减少或停止。局部缺血有时起因于血管收缩或血栓形成或栓塞。由于减少的氧(组织缺氧、缺氧)、葡萄糖和营养素供应引起的细胞死亡，局部缺血可造成直接的缺血性损伤、组织破坏。“组织缺氧”或“低氧条件”指其中细胞、器官或组织接收不到充足的氧供应的情况。“缺氧”指器官或组织中几乎完全没有氧气，如果持续，其可造成细胞、器官或组织死亡。

[0397] “与局部缺血相关的症状”、“由局部缺血引起的症状”或“局部缺血造成的症状”所指的症状包括但不限于：器官功能的受损或丧失(包括但不限于，脑、肾或心脏功能的受损或丧失)、痉挛、跛行、麻痹、刺痛、虚弱、疼痛、降低的伤口愈合、炎症、皮肤色素减退和坏疽。

[0398] “缺血性组织损伤”、“缺血性组织破坏”、“局部缺血引起的组织损伤”、“与局部缺血相关的组织损伤”、“局部缺血造成的组织损伤”、“局部缺血导致的组织损伤”和“局部缺血损坏的组织”指器官或组织或细胞由于一段时间缺血造成的形态、生理和/或分子损伤。

[0399] 在一个实施方案中，对象展现缺血性组织或缺血损坏的组织的至少一种症状。在具体的实施方案中，对象为人，其具有或存在具有缺血性组织或缺血损坏的组织的风险，例如，患有糖尿病、周围血管疾病、血栓闭塞性脉管炎、血管炎、心血管疾病、冠状动脉疾病或心力衰竭或脑血管疾病、心血管疾病或脑血管疾病的对象。

[0400] 在具体的实施方案中，本发明还提供了治疗缺血性组织或缺血损坏的组织的方法，包括将HSPC给予至需要此类治疗的患者，所述HSPC在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。

[0401] 在一个实施方案中，通过增加的干细胞归巢至缺血性组织损伤位点、缺血性组织位点处增加的内源干细胞和内皮祖细胞补充、缺血性组织位点处增加的血管形成刺激、减少的缺血性组织坏死或程序性细胞死亡，或者缺血性组织位点处增加的细胞存活，所述细胞为对象提供了治疗。

[0402] 在不同的其他实施方案中，本发明提供了治疗或改善缺血性组织损伤的方法，包括将包含HSPC的治疗有效量的组合物给予至对象，所述HSPC在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。

[0403] 在不同的其他实施方案中，本发明提供了治疗或改善与缺血性组织损伤相关的症状的方法，包括将HSPC给予至对象，所述HSPC在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。

[0404] 适于用本发明的组合物治疗的组织的示例性实例包括，中胚层组织、内胚层组织或外胚层组织。适于用本发明的组合物治疗的其他组织包括但不限于，皮肤组织、骨骼肌组织、心肌组织、平滑肌组织、软骨组织、肌腱组织、骨组织、脑组织、脊髓组织、视网膜组织、角膜组织、肺组织、肝组织、肾组织、胰腺组织、卵巢组织、睾丸组织、肠组织、胃组织和膀胱组织。

[0405] 在具体的实施方案中，具有受损的血液供应且为缺血性的或存在成为缺血性组织风险的任何组织均可使用本发明的方法进行治疗。

[0406] 能引起局部缺血或与局部缺血相关，或者增加对象的局部缺血风险，或者造成对象展现越来越多的局部缺血症状，并因此适于利用本发明方法进行治疗或改善的遗传性病患、综合征、外伤、慢性病症、医疗干预或其他病症的示例性实例，包括但不限于：急性冠脉综合征、急性肺损伤(ALI)、急性心肌梗塞(AMI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、动脉闭塞性疾病、动脉硬化、关节软骨缺损、无菌性全身性炎症、动脉粥样硬化性心血管疾病、自身免疫疾病、骨折、骨折、脑水肿、脑低灌、柏格氏疾病、烧伤、癌症、心血管疾病、软骨损伤、脑梗塞、脑缺血、脑中风、脑血管疾病、化疗引起的神经病、慢性感染、慢性肠系膜缺血、跛行、充血性心脏衰竭、结缔组织损伤、挫伤、冠状动脉疾病(CAD)、严重肢体缺血(CLI)、克罗恩氏疾病、深静脉血栓形成、深度伤口、溃疡愈合延迟、伤口愈合延迟、糖尿病(I型和II型)、糖尿病性神经病变、糖尿病引起的缺血、弥散性血管内凝血(DIC)、栓塞性脑缺血、移植物抗宿主病、冻伤、遗传性出血性毛细管扩张缺血性血管疾病、高氧损伤、组织缺氧、炎症、炎症性肠病、炎症性疾病、肌腱损伤、间歇性跛行、肠缺血、局部缺血、缺血性脑部疾病、缺血性心脏病、缺血性周围血管疾病、缺血性胎盘、缺血性肾脏疾病、缺血性血管疾病、缺血再灌注损伤、裂

伤、左冠状动脉主干病变、肢体缺血、下肢缺血、心肌梗塞、心肌缺血、器官缺血、骨关节炎、骨质疏松、骨肉瘤、帕金森氏病、外周动脉性疾病(PAD)、外周动脉疾病、外周局部缺血、周围神经病、周围血管疾病、初癌、肺水肿、肺栓塞、重构紊乱、肾缺血、视网膜缺血、视网膜病、败血症、皮肤溃疡、实体器官移植、脊椎损伤、中风、软骨下骨囊肿、血栓形成、血栓性脑缺血、组织缺血、短暂性脑缺血发作(TIA)、创伤性脑损伤、溃疡性结肠炎、肾血管疾病、血管炎性病症、希佩尔-林道综合征和组织或器官创伤。

[0407] 能引起局部缺血或与局部缺血相关,或者增加对象的局部缺血风险,或者造成对象展现越来越多的局部缺血症状、适于利用本发明方法进行治疗或改善的遗传性病患、综合征、外伤、慢性病症、医疗干预或其他病症的其他示例性实例包括,由于手术、化疗、放射治疗,或者细胞、组织或器官移植(transplant或graft)引起的缺血。

[0408] 在各种实施方案中,本发明的方法适合用于治疗脑血管缺血、心肌缺血、肢体缺血(CLI)、心肌缺血(尤其是慢性心肌缺血)、缺血性心肌病、脑血管缺血、肾缺血、肺缺血、肠缺血等。

[0409] 在各种实施方案中,本发明包括,本文公开的治疗细胞组合物可用于治疗缺血性组织,其中增加至组织的血流、氧气供应、葡萄糖供应或营养物供应是可取的。

[0410] 3.扩增的HSPC

[0411] 本发明还包括,本发明提供的增强的HSPC在给予至对象前不在离体下或在体外扩增。在具体的实施方案中,得到了未扩增的HSPC细胞群,在离体下根据本文提供的方案处理HSPC细胞群,以得到增强的HSPC,可洗涤所述增强的HSPC以去除处理试剂,并且所述增强的HSPC被给予患者而未在离体下扩增所述HSPC细胞群。在一些实施方案中,HSPC获自供体,包括脐带血,并且在处理HSPC之前或之后,或者在将治疗组合物给予至患者之前的任何时间未进行扩增。

[0412] 在一个实施方案中,处理了未扩增的HSPC细胞群,并且在细胞群中HSPC的任何实质性的离体细胞分裂之前,或者在任何实质性的离体细胞分裂所需的时间之前给予至患者。在其他实施方案中,处理了未扩增的HSPC细胞群,并在细胞群中HSPC的任何实质性的离体有丝分裂之前,或者在任何实质性的离体有丝分裂所需的时间之前给予至患者。在一些实施方案中,处理了未扩增的HSPC细胞群,并在细胞群中HSPC的倍增时间之前给予至患者。在一些实施方案中,处理了未扩增的HSPC细胞群,并在6、12或24小时的HSPC处理内给予至患者。在其他实施方案中,处理了未扩增的HSPC细胞群,并在2小时的HSPC处理内给予至患者。

[0413] 在各种实施方案中,本发明的HSPC在离体下以一种或多种试剂或试剂组合处理前或在给予至患者前的任何时间,未进行培养。在一些实施方案中,HSPC培养了少于约24小时。在其他实施方案中,HSPC培养了少于约12小时、10小时、8小时、6小时、4小时或2小时。

[0414] 在其他实施方案中,本发明提供了HSPC,其在以试剂处理HSPC前进行了扩增,以获得增强的HSPC。获自脐带血、骨髓、外周血、沃顿氏胶、胎盘血或其他来源的HSPC,可以在任何合适的、可商购的或定制的根据需要有或无血清的培养基中生长或扩增(参见,例如Hartshorn et al.,Cell Technology for Cell Products,第221-224页,R.Smith,Editor;Springer Netherlands,2007,其通过引用整体并入本文)。例如,在某些实施方案中,无血清的培养基可以利用白蛋白和/或转铁蛋白,其已被证明可用于无血清培养基中

$CD34^+$细胞的生长和扩增。另外，可以包含细胞因子如Flt-3配体、干细胞因子(SCF)和促血小板生成素(TPO)等。还可将HSPC培养在诸如生物反应器的容器中(参见，例如Liu et al., Journal of Biotechnology124:592-601,2006,其通过引用整体并入本文中)。可用于离体扩增HSPC的合适的培养基还可包含支撑细胞如基质细胞(例如，淋巴网状基质细胞)，其可以来源于，例如淋巴组织的解聚，并且其已被证明能支撑造血干细胞和祖细胞的体外、离体和体内维持、生长和分化，以及它们的子代。

[0415] 在各种实施方案中，被给予至对象的增强的HSPC为异质细胞群，其包含全骨髓、脐带血、动员的外周血、造血干细胞、造血祖细胞和造血干细胞和祖细胞的子代，包括粒细胞(例如前髓细胞、髓细胞、晚幼粒细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)、红细胞(如网织红细胞、红血球)、血小板(例如，原巨核细胞、产生血小板的巨核细胞、血小板)，以及单核细胞(例如，单核细胞、巨噬细胞)。

[0416] 4.给予HSPC及其组合物

[0417] 在各种实施方案中，本发明部分提供了包括将处理的HPSC给予至有需要的对象的方法。给予本文所述方法中使用的细胞群的合适的方法包括肠胃外给药，包括但不限于血管内给药的方法，如静脉内和动脉内给药。其他给予本发明细胞的示例性方法包括肌肉内、鞘内、囊内、眼眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0418] 在一个实施方案中，增加HSPC归巢或移植的方法包括经肠胃外给予HSPC，所述HSPC在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。

[0419] 在一个实施方案中，用于造血细胞重建、造血系统重建或进行造血干细胞细胞移植的方法，包括经肠胃外给予HSPC，所述HSPC在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。

[0420] 在优选的实施方案中，HSPC经静脉内给予或输注到对象。

[0421] 在本文所述的用于增加HSPC归巢或移植、治疗需要造血细胞重建、造血系统重建的对象或进行造血干细胞移植的方法的示例性具体实施方案中，包括经静脉内给予或输注HSPC，所述HSPC用包括以下试剂的一种或多种试剂的组合进行了处理：(i)PGE2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE2、20-乙基PGE_2或8-异-16-环己基-四去甲PGE_2，及(ii)糖皮质激素。在更具体的实施方案中，所述方法包括经静脉内给予或输注HSPC，所述HSPC以(i)PGE_2或16,16-二甲基PGE_2，及(ii)甲羟松、氢化可的松、地塞米松、甲基泼尼松龙、去炎松或阿氯米松进行了处理。在更具体的实施方案中，所述方法包括经静脉内给予或输注HSPC，所述HSPC以(i)PGE_2或16,16-二甲基PGE_2，及(ii)甲羟松进行了处理。

[0422] 在具体的实施方案中，可将所述组合物给予至具有局部缺血、缺血性组织或至少一种缺血症状的个体。最优选地，给药位点靠近或最接近预期的活性位点，即接近组织缺血位点。在对象患有全缺血的情况下，全身给药如静脉内给药是优选的。撇开机制的束缚，在给予治疗组合物时，HSPC响应由于损伤产生的趋化因子而迁移或归巢至缺血性组织，从而

产生缺血性组织的治疗或与缺血性组织相关的至少一种症状的治疗和改善。

[0423] 可将HSPC直接注射入缺血区域，或者可将干细胞输入动脉来供应组织缺血区域。若对象具有完全闭塞的本应正常供应缺血性组织区域的血管，所选的用于输注的动脉优选为在完全闭塞的血管分布中向缺血性组织提供侧支血流的血管。

[0424] 可将本发明的HSPC和治疗组合物注入递送装置中，其能有助于通过注射或移植引入到对象中。此类递送装置可包括管，例如用于将细胞和流体注入受体对象身体的导管。在一个实施方案中，导管还另外具有针，例如注射器，可通过注射器在预期位置将本发明细胞引入至对象。在具体的实施方案中，细胞经配制用于经导管给予至血管中(其中术语“导管”旨在包括各种用于将物质递送至血管的导管样体系中的任何一种)。

[0425] 在一个实施方案中，治疗缺血性组织或缺血损坏的组织的方法包括经肠胃外给予HSPC，所述HSPC在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。

[0426] 在一个实施方案中，治疗或改善与缺血性组织或缺血损坏的组织相关的至少一种症状的方法包括经肠胃外给予HSPC，所述HSPC在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下，与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂，包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。

[0427] 在优选的实施方案中，HSPC经静脉内给药或通过直接注射至缺血性位点给药。

[0428] 在本文所述的用于治疗或改善局部缺血或至少一种局部缺血症状的方法的示例性具体实施方案中，包括经静脉内给予或直接注射HSPC，所述HSPC用包括以下试剂的一种或多种试剂进行了处理：(i)PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2或8-异-16-环己基-四去甲PGE_2，及(ii)糖皮质激素。在更具体的实施方案中，所述方法包括经静脉内给予或输注HSPC，所述HSPC以(i)PGE_2或16,16-二甲基PGE_2，及(ii)甲羟松、氢化可的松、地塞米松、甲基泼尼松龙、去炎松或阿氯米松进行了处理。在更具体的实施方案中，所述方法包括经静脉内给予或输注HSPC，所述HSPC以(i)PGE_2或16,16-二甲基PGE_2，及(ii)甲羟松进行了处理。

[0429] 在具体的实施方案中，可将所述组合物局部给予至缺血性组织损伤位点，如伤口表面，例如未愈合伤口、溃疡、烧伤或冻伤。

[0430] 本发明的组合物可经特别配置用于以固体或液体形式给药，包括适于以下给药的那些形式：(1)肠胃外给药，例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射，如无菌溶液或悬浮液，或缓释制剂，作为细胞移植物、生物相容的支架等的一部分。在各种实施方案中，提供了生物相容的支架或移植物，以促进损坏的、损伤的或患病的组织或器官如缺血性组织的修复、替换和/或再生。

[0431] 在某些示例性的实施方案中，治疗需要本发明HPSC的对象的方法包括，提供包含本发明HPSC的生物相容的支架或细胞移植物。如本文所用，术语“生物相容的支架”或“细胞移植物”指生物相容的天然的和/或合成的结构，其包含一种或多种基于细胞的组合物、细胞、组织、聚合物、多核苷酸、栅格(lattice)和/或基质，它们被注射、施用于患者或对象表面，或移植在患者或对象中，该患者或对象适于在体内引导或吸引基于细胞的组合物以修

复、再生或取代细胞、组织或器官。

[0432] 在示例性具体实施方案中，植入物包含生物相容的基质，其可塑造成任何合适的形式，并且具有特别重要的作用以将组织准备为具有一定深度或高度的三维形状或平板样形状以施用于皮肤伤口。生物材料科学是已建立且正在发展的领域(Takayama et al., Principles of Tissue Engineering,Second Edition,edit Lanza RP,Langer R, Vacanti J.,Academic Press,San Diego,2000,pg 209-218;Saltmann et al., Principles of Tissue Engineering,Second Edition,edit Lanza RP,Langer R, Vacanti J.,Academic Press,San Diego,2000,p 221-236;Hubbell et al,Principles of Tissue Engineering,Second Edition,edit Lanza RP,Langer R,Vacanti J., Academic Press,San Diego,2000,p 237-250;Thomson et al,Principles of Tissue Engineering,Second Edition,edit Lanza RP,Langer R,Vacanti J.,Academic Press, San Diego,2000,p 251-262;Pachence et al,Principles of Tissue Engineering, Second Edition,edit Lanza RP,Langer R,Vacanti J.,Academic Press,San Diego, 2000,p 263-278)。

[0433] 化学家已开发出了合成包含聚合物的生物相容性支架的方法，以在体外、离体和体内引导和调节细胞生长。可调节聚合物的物理性能以制备具有特定强度和黏度的固体和液体基质。一些聚合物在体内是稳定的，并且将在患者体内维持多达1、2、3、4、5、10、15年或更多年。其他聚合物还是可生物降解的，能随时间以固定速度吸收，以允许被新合成的胞外基质蛋白替代。吸收可在移植后几天至几周或数月内发生(Pachence et al.,Principles of Tissue Engineering,Second Edition,edit Lanza RP,Langer R,Vacanti J., Academic Press,San Diego,2000,p 263-278)。

[0434] 在其他示例性的实施方案中，生物相容的支架包含可生物吸收的材料。多孔载体优选由选自以下的一种组分或多种组分的组合组成：胶原、胶原衍生物、透明质酸、透明质酸盐、壳聚糖、壳聚糖衍生物、聚轮烷、聚轮烷衍生物、壳质、壳质衍生物、明胶、纤连蛋白、肝素、层粘连蛋白和藻酸钙；其中载体构件由选自以下的一种组分或多种组分的组合组成：聚乳酸、聚乙醇酸、聚己内酯、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物、聚乳酸-聚己内酯共聚物和聚乙醇酸-聚己内酯共聚物(参见，例如美国专利第5,077,049和5,42,033号，以及美国专利申请公开第2006/0121085号，其中每个专利和申请的聚合物制剂及其制备方法通过引用整体并入本文)。

[0435] 在本发明的示例性具体实施方案中，生物相容的支架或细胞移植物包含粘性的、生物相容的液体材料。生物相容的液体可在体温下胶化，并且其选自藻酸盐、胶原、纤维蛋白、透明质或血浆。所述粘性的、生物相容的液体材料还可与能填充不规则组织缺陷的有延展性的三维基质组合。所述基质材料包括但不限于，聚乙醇酸-聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸或缝合样材料。

[0436] 在其他示例性的实施方案中，可将包含基质的生物相容性支架或细胞移植物塑造成有利于或促进细胞、组织和/或器官发育的所需形状(例如，二维或三维结构)。植入物可由具有纤维如网眼或海绵的聚合材料形成。此类结构提供了细胞可在其上生长和增殖的足够区域。可取地，支架或细胞移植物的基质可随时间发生生物降解，以便在动物发育时将它们吸入至动物物质中。合适的聚合物可为均聚物或杂聚物，并且可由包括但不限于乙醇酸、

乳酸、延胡索酸丙酯、己内酯等的单体形成。其他合适的聚合物材料可包含蛋白、多糖、多羟酸、聚原酸酯、聚酐、聚磷腈(polyphosphozene)或合成的聚合物,特别是可生物降解的聚合物或其任何组合。

[0437] 薄片样支架和移植物可为皮组织、用于牙根覆盖方案的膜、膜组织(例如,硬脑膜)、扁骨(例如,头骨、胸骨)等提供修缮性的替代物和/或再生性治疗。管状植入物和移植物可为动脉、静脉、输尿管、尿道、神经、长骨(例如,股骨、腓骨、胫骨、肱骨、桡骨、尺骨、掌骨、跖骨等)等提供修缮性的替代物和/或再生性治疗。其他的三维植入物和移植物可为器官移植(例如,肝、肺、皮肤、心脏、胰腺等)、骨重建或所有类型骨的修缮、牙植入物或者为肌肉、肌腱、韧带和软骨植入物提供修缮性的替代物和/或再生性治疗。

[0438] 在一个实施方案中,治疗或改善与缺血性组织或缺血损坏的组织相关的至少一种症状的方法,包括将包含HSPC的生物相容性支架或细胞移植物直接给予至缺血性组织,所述HSPC在足以将细胞的CXCR4基因表达增加为未接触的细胞的CXCR4基因表达水平的至少30、40、50、60、70或80倍的条件下,与能增加细胞的CXCR4基因表达的一种或多种试剂,包括前列腺素通路激动剂与糖皮质激素的组合进行了接触。

[0439] 在本文所述的用于治疗或改善与缺血性组织或缺血损坏的组织有关的至少一种症状的方法的示例性具体实施方案中,包括将包含HSPC的生物相容性支架或细胞移植物直接给予至缺血性组织,所述HSPC用包括以下试剂的一种或多种试剂的组合进行了处理:(i)PGE_2、dmPGE_2、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2或8-异-16-环己基-四去甲PGE_2,及(ii)糖皮质激素。在更具体的实施方案中,所述方法包括将包含HSPC的生物相容性支架或细胞移植物直接给予至缺血性组织,所述HPSC以(i)PGE_2或16,16-二甲基PGE_2,及(ii)甲羟松、氢化可的松、地塞米松、甲基泼尼松龙、去炎松或阿氯米松进行了处理。在更具体的实施方案中,所述方法包括将包含HSPC的生物相容性支架或细胞移植物直接给予至缺血性组织,所述HPSC以(i)PGE_2或16,16-二甲基PGE_2,及(ii)甲羟松进行了处理。

[0440] F.本发明的即可给药的组合物

[0441] 本发明处理的细胞的组合物为无菌的,并适于且即可对人患者给药(即,可不经过任何进一步处理给药)。在一些实施方案中,所述治疗组合物即可输入至患者。如本文所用,术语“即可给药的”、“即可给药”或“即可输注”指本发明的基于细胞的组合物在移植或给予至对象前不需要任何进一步处理或操作。

[0442] 适于给予至患者的无菌的且治疗上可接受的组合物可包含一种或多种药学可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂(例如,药学可接受的介质如细胞培养基),或其他药学可接受的组分。药学可接受的载体和/或稀释剂部分地取决于被给予的具体组合物,以及用于给予所述治疗组合物的具体方法。因此,本发明的治疗组合物存在多种合适的制剂(参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.1985))。

[0443] 在具体的实施方案中,包含干细胞和/或祖细胞的治疗细胞组合物含有药学可接受的细胞培养基。包含本发明基于细胞的组合物的治疗组合物可以通过肠道或肠胃外给药方法单独给药,或结合其他合适的化合物给药以实现预期的治疗目标。

[0444] 药学可接受的载体和/或稀释剂必须具有足够高的纯度,和足够低的毒性,使得其适于给予至受治疗的人对象。进一步地,应当维持或增加治疗组合物的稳定性。药学可接受的载体可为液体或固体,并且当组合本发明治疗组合物的其他组分时,可在考虑计划的给

药方式的情况下进行挑选，以提供所需的量、一致性等。例如，药学可接受的载体可以为但不限于，粘合剂(例如，预胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等)、填充剂(例如，乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯、磷酸氢钙等)、润滑剂(例如，硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶态二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸金属盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等)、崩解剂(例如，淀粉、羧基乙酸淀粉钠等)，或者润湿剂(例如，十二烷基硫酸钠等)。可用于本发明组合物的其他合适的药学可接受的载体包括但不限于，水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0445] 此类载体溶液还可包含缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂。如本文所用，术语“缓冲剂”指化学组成能中和酸或碱而不显著改变pH的溶液或液体。本发明包括的缓冲剂实例包括但不限于，杜氏磷酸盐缓冲盐水(PBS)、林格氏溶液、5％葡萄糖水溶液(D5W)、普通/生理盐水(0.9％NaCl)。

[0446] 这些药学可接受的载体和/或稀释剂可以足以将治疗组合物的pH维持在约3至约10的量存在。鉴于此，缓冲剂基于重量/重量比可为整个组合物的约5％。所述治疗组合物中还可包含电解质，如但不限于氯化钠和氯化钾。

[0447] 在一个方面，所述治疗组合物的pH范围为约4至约10。可选地，所述治疗组合物的pH范围可为约5至约9、约6至约9，或约6.5至约8。在另一实施方案中，所述治疗组合物包含的缓冲剂具有的pH在所述pH范围的一个中。在另一实施方案中，所述治疗组合物具有的pH为约7。可选地，所述治疗组合物具有的pH范围为约6.8至约7.4。在又一个实施方案中，所述治疗组合物具有的pH为约7.4。

[0448] 本发明的无菌组合物可为无菌溶液或在无毒的药学可接受的介质中的悬浮液。如本文所用，术语“悬浮”可指未粘附的条件，其中细胞未贴附至固体载体。例如，可搅动保持悬浮的细胞，并且其未粘附至载体如培养皿。

[0449] 悬浮液为分散态(混合物)，其中细碎的物质与另一物质组合，因前者细碎且混合得极好，以至于其不会快速沉淀出来。可使用媒介物如液体介质，包括溶液制备悬浮液。在具体的实施方案中，本发明的治疗组合物为悬浮液，其中干细胞和/或祖细胞分散在可接受的液体介质或溶液中，例如盐水或无血清培养基，且未贴附至固体载体。在日常生活中，最常见的悬浮液为固体悬浮于液态水中的那些。可使用的可接受的稀释剂如媒介物和溶剂，包括水、林格氏溶液、等渗氯化钠(盐水)溶液和无血清的细胞培养基。在一些实施方案中，高渗溶液被用于制备悬浮液。另外，无菌的固定油被常规用作溶剂或悬浮介质。对于肠胃外施用，特别合适的媒介物由溶液优选油或水溶液以及悬浮液、乳剂或埋植剂组成。水悬浮液可含有能增加悬浮液黏度的物质，并且包括，例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。在一些实施方案中，输注溶液对于对象组织为等渗的。在一些实施方案中，输注溶液对于对象组织为高渗的。

[0450] 药学可接受的载体、稀释剂和其他包含本发明的即可给药的治疗组合物的组分衍生自美国制药级别试剂，该试剂将允许治疗组合物应用于临床方案。通常，这些完成的试剂，包括任何介质、溶液或其他药学可接受的载体和/或稀释剂，以本领域常规方法除菌如过滤除菌，并在使用前检测各种不良污染物如支原体、内毒素或病毒污染物。一个实施方案中，药学可接受的载体为基本上无人或动物来源的天然蛋白，并且适于储存包含造血干细

胞和祖细胞的治疗组合物的细胞群。所述治疗组合物旨在给予至人患者，并因此基本上无细胞培养物组分如牛血清白蛋白、马血清和胎牛血清。

[0451] 本发明部分还包括药学可接受的细胞培养基特别是本发明的组合物和/或培养物的应用。此类组合物适于给予至人对象。一般而言，任何能支撑所需的本发明的重编程和/或编程细胞的维持、生长和/或健康的介质都适于用作药用细胞培养基。在具体的实施方案中，所述药学可接受的细胞培养基为无血清的培养基。

[0452] 所述治疗组合物可包含适于储存含有该组合物的细胞群的无血清培养基。在各种实施方案中，无血清培养基为无动物成分的，并且可以任选地无蛋白。任选地，所述培养基可包含生物药物可接受的重组蛋白。“无动物成分的”培养基指其中的组分来源于非动物来源的培养基。在无动物成分的培养基中，重组蛋白替代天然动物蛋白，并且营养物获自合成的植物或微生物来源。相反，无蛋白的培养基定义为基本上无蛋白。

[0453] 本发明所用的无血清培养基为适合用于人治疗方案和产品的制剂。一种无血清的培养基为美国专利第5,945,337号中描述的QBSF-60(Quality Biological,Inc.)。QBSF-60以美国制药级别组分进行优化，并且由下列物质组成：基础培养基IMDM加2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、人可注射级别的血清白蛋白(4mg/ml)(Alpha Therapeutic Corporation)、部分铁饱和的人转铁蛋白(300μg/ml)(Sigma Chemical Corporation或Bayer Corporation)和人重组胰岛素钠(0.48U/ml)(Sigma)。本领域已知的其他无血清的培养基包括但不限于：Life Technologies Catalogue StemPro-34无血清培养基；Capmany,et al.,Short-term,serum-free,static culture of cord blood-derived $CD34^+$cells:effects of FLT3-L and MIP-1αon in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells(短期无血清静态培养脐带血衍生的细胞$CD34^+$:FLT3-L和MIP-1α对体外扩增造血祖细胞的作用),Haematologica 84:675-682(1999);Daley,J P,et al.,Ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells in serum-free StemProTM-34Medium(在无血清的StemProTM-34培养基中离体扩增人造血祖细胞),Focus 18(3):62-67;Life Technologies Catalogue关于AIM V无血清培养基的信息；BioWhittaker Catalogue关于X-VIVO 10无血清培养基的信息；5,397,706享有的用于造血细胞和白血病细胞的无血清基本培养基；无细胞增殖；Kurtzberg et al.,18:153-4(2000);Kurtzberg et al.,Exp Hematol 26(4):288-98(April 1998)。

[0454] 本领域技术人员应当理解培养基的上述实例为示例性的，并且完全不限制适合用于本发明的培养基制剂，并且本领域还存在许多已知的和合适的此类培养基。

[0455] 在各种实施方案中，本发明的治疗组合物包含人血清白蛋白(HSA)的无菌溶液如5%HSA和低分子量(LMW)葡聚糖。

[0456] 所述治疗组合物基本上无支原体、内毒素和微生物污染。在具体的实施方案中，所述治疗组合物包含少于约10、5、4、3、2、1、0.1、0.05μg/ml的牛血清白蛋白。

[0457] 关于内毒素，“基本上无”是指每剂量的细胞存在比FDA针对生物允许的量更少的内毒素，所述量为每天5EU/kg体重的总内毒素，其对平均为70kg人来说为每细胞总剂量350EU。

[0458] 关于支原体和微生物污染，如本文所用，“基本上无”指本领域技术人员已知的普遍接受的检测读数为阴性。例如，支原体污染通过下述方式测定：将所述治疗组合物样品传

代接种至液体培养基中，并在第1天、第3天、第7天和第14天于37℃涂布在琼脂板上，其带有合适的阳性和阴性对照。用显微镜在100×下将样品外观与阳性和阴性对照的外观比较。另外，将接种的指示细胞培养物孵育3天和5天，并使用结合DNA的荧光染料，通过表面荧光显微镜在600×下检查支原体存在。如果琼脂和/或液体培养基方案和指示细胞培养方案未显示支原体污染证据，则认为样品是令人满意的。

[0459] 本申请还涉及以下技术方案：

[0460] 1.人造血干细胞或祖细胞，包括：

[0461] a)造血干细胞或祖细胞，其在离体下已与一种或多种增加所述细胞中CXCR4基因表达的试剂接触；以及

[0462] b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约30倍。

[0463] 2.如实施方案1所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述一种或多种试剂包括(i)一种或多种前列腺素通路激动剂；和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0464] 3.如实施方案2所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0465] 4.如实施方案2所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述前列腺素通路激动剂选自：PGE_2、dmPGE_2、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0466] 5.如实施方案2所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述前列腺素通路激动剂包括PGE_2，或者PGE_2类似物或衍生物。

[0467] 6.如实施方案2所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE2。

[0468] 7.如实施方案2所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氯米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇(difluorocortolone)、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁(fluocoritin butyl)、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0469] 8.如实施方案2所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述糖皮质激素为甲羟松。

[0470] 9.如实施方案1所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触至少约1小时的时间。

[0471] 10.如实施方案1所述的造血干细胞或祖细胞，其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约6小时的时间。

[0472] 11.如实施方案1所述的造血干细胞或祖细胞,其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约6小时的时间。

[0473] 12.如实施方案1所述的造血干细胞或祖细胞,其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约4小时的时间。

[0474] 13.如实施方案1所述的造血干细胞或祖细胞,其中所述细胞获自骨髓、脐带血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘或胎血。

[0475] 14.包含细胞群的治疗组合物,所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞,其中:

[0476] a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与一种或多种增加人造血干细胞或祖细胞中CXCR4表达的试剂接触;以及

[0477] b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约30倍。

[0478] 15.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述一种或多种试剂包括(i)一种或多种前列腺素通路激动剂,和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0479] 16.如实施方案14所述的治疗组合物,其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约40倍。

[0480] 17.如实施方案15所述的治疗组合物,其中所述前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0481] 18.如实施方案15所述的治疗组合物,其中所述前列腺素通路激动剂选自:PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0482] 19.如实施方案15所述的治疗组合物,其中所述前列腺素通路激动剂包括PGE_2,或者PGE_2类似物或其衍生物。

[0483] 20.如实施方案15所述的治疗组合物,其中所述前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0484] 21.如实施方案15所述的治疗组合物,其中所述糖皮质激素选自:甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇(difluorocortolone)、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0485] 22.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述造血干细胞或祖细胞已与以下中的至少一种接触至少约1小时的时间:(i)一种或多种前列腺素通路激动剂,或(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0486] 23.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述造血干细胞或祖细胞已与以下中的至少一种接触约2小时至约24小时的时间:(i)一种或多种前列腺素通路激动剂,或(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0487] 24.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述造血干细胞或祖细胞已与以下中的至少一种接触约2小时至约6小时的时间:(i)一种或多种前列腺素通路激动剂,或(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0488] 25.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述造血干细胞或祖细胞已与以下中的至少一种接触约4小时的时间:(i)一种或多种前列腺素通路激动剂,或(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0489] 26.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群包含少于约0.10%、0.50%、1.0%、3%、5%、10%、15%、20%或30%的$CD34^+$细胞。

[0490] 27.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群包含至少约0.01%且不大于约50%的$CD34^+$细胞。

[0491] 28.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群包含至少约1%的$CD34^+$细胞。

[0492] 29.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群包含至少约3%的$CD34^+$细胞。

[0493] 30.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群包含至少约5%的$CD34^+$细胞。

[0494] 31.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群包含至少约90%的$CD34^+$细胞。

[0495] 32.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群包含至少约95%的$CD34^+$细胞。

[0496] 33.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群未在离体下扩增。

[0497] 34.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述组合物在现场即时产生,且被给予至患者而未经培养所述细胞群。

[0498] 35.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述组合物经过洗涤且基本上无所述一种或多种试剂。

[0499] 36.如实施方案14所述的治疗组合物,其中所述细胞群获自骨髓、胎肝、胎血、胎盘、胎盘血、脐带血或动员的外周血。

[0500] 37.制备人造血干细胞或祖细胞的方法,包括

[0501] a)使所述造血干细胞或祖细胞在离体下与一种或多种增加所述细胞中CXCR4基因表达的试剂接触;其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞,所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约30倍。

[0502] 38.如实施方案37所述的方法,其中所述一种或多种试剂包含(i)一种或多种前列腺素通路激动剂;和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0503] 39.如实施方案37所述的方法,其中所述前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0504] 40.如实施方案37所述的方法,其中所述前列腺素通路激动剂选自PGE_2、$dmPGE_2$、15

(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0505] 41.如实施方案37所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括PGE_2，或者PGE_2类似物或衍生物。

[0506] 42.如实施方案37所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0507] 43.如实施方案37所述的方法，其中所述糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0508] 44.如实施方案37所述的方法，其中所述糖皮质激素为甲羟松。

[0509] 45.如实施方案37所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触至少约1小时的时间。

[0510] 46.如实施方案37所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约24小时的时间。

[0511] 47.如实施方案37所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约6小时的时间。

[0512] 48.如实施方案37所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约4小时的时间。

[0513] 49.如实施方案37所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞获自骨髓、脐带血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘或胎血。

[0514] 50.制备治疗组合物的方法，包括：

[0515] 使造血干细胞或祖细胞在离体下与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触；其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约30倍。

[0516] 51.如实施方案50所述的方法，其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞中CXCR4基因的表达增加为至少约40倍。

[0517] 52.如实施方案50所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0518] 53.如实施方案50所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂选自PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0519] 54.如实施方案50所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括PGE_2，或者PGE_2

类似物或其衍生物。

[0520] 55.如实施方案50所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0521] 56.如实施方案50所述的方法，其中所述糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0522] 57.如实施方案50所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触至少约1小时的时间。

[0523] 58.如实施方案50所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约6小时的时间。

[0524] 59.如实施方案50所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约4小时的时间。

[0525] 60.如实施方案50所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约4小时的时间。

[0526] 61.如实施方案50所述的方法，其中所述细胞群包含少于约0.10％、0.50％、1.0％、3％、5％、10％、15％、20％或30％的$CD34^+$细胞。

[0527] 62.如实施方案50所述的方法，其中所述细胞群包含至少约0.01％且不大于约50％的$CD34^+$细胞。

[0528] 63.如实施方案50所述的方法，其中所述细胞群包含少约1％的$CD34^+$细胞。

[0529] 64.如实施方案50所述的方法，其中所述细胞群包含至少约3％的$CD34^+$细胞。

[0530] 65.如实施方案50所述的方法，其中所述细胞群包含至少约5％的$CD34^+$细胞。

[0531] 66.如实施方案50所述的方法，其中所述细胞群未在离体下扩增。

[0532] 67.如实施方案50所述的方法，其中所述组合物在现场即时产生，且被给予至患者而未经培养所述细胞群。

[0533] 68.如实施方案50所述的方法，其中所述组合物经过洗涤且基本上无(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0534] 69.如实施方案50所述的方法，其中所述细胞群获自骨髓、胎肝、胎血、胎盘、胎盘血、脐带血或动员的外周血。

[0535] 70.治疗需要细胞治疗的对象的方法，包括将实施方案1所述的人造血干细胞或祖细胞给予至所述对象。

[0536] 71.如实施方案70所述的方法，其中所述对象患有急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、青少年髓单核细胞性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、严重型再生不良性贫血、范康尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、纯红细胞再生障碍、巨核细胞缺乏/先天性血小板减少症、重症复合性免疫缺陷综合征(SCID)、威斯科特-奥尔德里奇综合征、β-重型地中海贫血、镰状细胞疾病、赫尔勒综合征、肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质病变、脊髓发育不良、难治性贫血、慢性髓单核细胞白血病、特发性髓样化生、家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症、实体瘤、慢性肉芽肿性疾病、黏多醣症或Diamond Blackfan贫血。

[0537] 72.如实施方案70所述的方法，其中所述对象患有乳腺癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或肉瘤。

[0538] 73.如实施方案70所述的方法，其中所述对象已接受了骨髓消融或非清髓性化疗或放射治疗。

[0539] 74.如实施方案70所述的方法，其中所述对象为骨髓供体。

[0540] 75.如实施方案70所述的方法，其中所述对象具有缺血性组织或由于局部缺血损坏的组织。

[0541] 76.如实施方案70所述的方法，其中所述对象具有至少一种与缺血性组织或由于局部缺血损坏的组织相关的症状。

[0542] 77.如实施方案75或76所述的方法，其中所述局部缺血与以下相关：急性冠脉综合征、急性肺损伤(ALI)、急性心肌梗塞(AMI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、动脉闭塞性疾病、动脉硬化、关节软骨缺损、无菌性全身性炎症、动脉粥样硬化性心血管疾病、自身免疫性疾病、骨折、骨折、脑水肿、脑低灌、柏格氏疾病、烧伤、癌症、心血管疾病、软骨损伤、脑梗塞、脑缺血、脑中风、脑血管疾病、化疗引起的神经病变、慢性感染、慢性肠系膜缺血、跛行、充血性心脏衰竭、结缔组织损伤、挫伤、冠状动脉疾病(CAD)、严重肢体缺血(CLI)、克罗恩氏疾病、深静脉血栓形成、深度伤口、溃疡愈合延迟、伤口愈合延迟、糖尿病(I型和II型)、糖尿病性神经病变、糖尿病引起的局部缺血、弥散性血管内凝血(DIC)、栓塞性脑缺血、移植物抗宿主疾病、遗传性出血性毛细管扩张缺血性血管疾病、高氧损伤、组织缺氧、炎症、炎症性肠病、炎症性疾病、肌腱受伤、间歇性跛行、肠缺血、局部缺血、缺血性脑部疾病、缺血性心脏病、缺血性周围血管疾病、缺血性胎盘、缺血性肾脏疾病、缺血性血管疾病、缺血再灌注损伤、裂伤、左主干冠状动脉疾病、肢体缺血、下肢缺血、心肌梗塞、心肌缺血、器官缺血、骨关节炎、骨质疏松、骨肉瘤、帕金森氏病、外周动脉性疾病(PAD)、外周动脉疾病、外周局部缺血、周围神经病、周围血管疾病、初癌、肺水肿、肺栓塞、重构紊乱、肾缺血、视网膜缺血、视网膜病、败血症、皮肤溃疡、实体器官移植、脊椎损伤、中风、软骨下骨囊肿、血栓形成、血栓性脑缺血、组织缺血、短暂性脑缺血发作(TIA)、创伤性脑损伤、溃疡性结肠炎、肾血管疾病、血管炎性病症、希佩尔-林道综合征和组织或器官创伤。

[0543] 78.增加对象中的造血干细胞和祖细胞归巢和/或移植的方法，包括将包含细胞群的组合物给予至对象，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中：

[0544] a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与增加所述细胞中的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触；并且

[0545] b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0546] 79.如实施方案78所述的方法，其中所述一种或多种试剂包含(i)一种或多种前列腺素通路激动剂；和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0547] 80.如实施方案78所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包含选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0548] 81.如实施方案78所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂选自：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0549] 82.如实施方案78所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或衍生物。

[0550] 83.如实施方案78所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0551] 84.如实施方案78所述的方法，其中所述糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0552] 85.如实施方案78所述的方法，其中所述糖皮质激素为甲羟松。

[0553] 86.如实施方案78所述的方法，其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触至少约1小时的时间。

[0554] 87.如实施方案78所述的方法，其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约24小时的时间。

[0555] 88.如实施方案78所述的方法，其中所述干细胞或祖细胞已与至少1种试剂接触约2小时至约6小时的时间。

[0556] 89.如实施方案78所述的方法，其中所述干细胞或祖细胞已与至少1种试剂接触约2小时至约4小时的时间。

[0557] 90.如实施方案78所述的方法，其中所述细胞获自骨髓、脐带血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘或胎血。

[0558] 91.增加对象中的造血干细胞和祖细胞归巢和/或移植的方法，包括将包含细胞群的组合物给予至对象，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中：

[0559] a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触；并且

[0560] b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0561] 92.如实施方案91所述的方法，其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约40倍。

[0562] 93.如实施方案91所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0563] 94.如实施方案91所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂选自PGE_2、dmPGE_2、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0564] 95.如实施方案91所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2类似物或其衍生物。

[0565] 96.如实施方案91所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0566] 97.如实施方案91所述的方法，其中所述糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0567] 98.如实施方案91所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触至少约1小时的时间。

[0568] 99.如实施方案91所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约6小时的时间。

[0569] 100.如实施方案91所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约4小时的时间。

[0570] 101.如实施方案91所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约4小时的时间。

[0571] 102.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群包含至少约0.10％、0.50％、1.0％、3％、5％、10％、15％、20％或30％的$CD34^+$细胞。

[0572] 103.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群包含至少约0.01％且不大于约50％的$CD34^+$细胞。

[0573] 104.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群包含至少约1％的$CD34^+$细胞。

[0574] 105.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群包含至少约3％的$CD34^+$细胞。

[0575] 106.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群包含至少约5％的$CD34^+$细胞。

[0576] 107.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群包含至少约90％的$CD34^+$细胞。

[0577] 108.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群包含至少约95％的$CD34^+$细胞。

[0578] 109.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群未在离体下扩增。

[0579] 110.如实施方案91所述的方法，其中所述组合物在现场即时产生，且被给予至患者而未经培养所述细胞群。

[0580] 111.如实施方案91所述的方法，其中所述组合物经过洗涤且基本上无一种或多种试剂。

[0581] 112.如实施方案91所述的方法，其中所述细胞群获自骨髓、胎肝、胎血、胎盘、胎盘血、脐带血或动员的外周血。

[0582] 113.如实施方案78或91所述的方法，其中所述对象患有急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、青少年髓单核细胞性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、严重型再生不良性贫血、范康尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、纯红细胞再生障碍、巨核细胞缺乏/先天性血小板减少症、重症复合性免疫缺陷综合征(SCID)、威斯科特-奥尔德里奇综合征、β-重型地中海贫血、镰状细胞疾病、赫尔勒综合征、肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质病变、脊髓发育不良、难治性贫血、慢性髓单核细胞白血病、特发性髓样化生、家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症或实体瘤。

[0583] 114.如实施方案78或91所述的方法，其中所述对象患有乳腺癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或肉瘤。

[0584] 115.如实施方案78或91所述的方法，其中所述对象已接受了骨髓消融或非清髓性化疗或放射治疗。

[0585] 116.如实施方案78或91所述的方法，其中所述对象为骨髓供体。

[0586] 117.如实施方案78或91所述的方法，其中所述细胞群为所述对象自体的。

[0587] 118.如实施方案78或91所述的方法，其中所述细胞群从所述对象的外周血或骨髓动员而来。

[0588] 119.如实施方案78或91所述的方法，其中所述细胞群对所述对象为同种异体的。

[0589] 120.增加对象中的造血干细胞和祖细胞重建的方法，包括将包含细胞群的组合物给予至所述对象，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中：

[0590] a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与增加细胞中的CXCR4基因表达的一种或多种试剂接触；并且

[0591] b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0592] 121.如实施方案120所述的方法，其中所述一种或多种试剂包含(i)一种或多种前列腺素通路激动剂；和(ii)一种或多种糖皮质激素。

[0593] 122.如实施方案121所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0594] 123.如实施方案121所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂选自PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0595] 124.如实施方案121所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2

类似物或衍生物。

[0596] 125.如实施方案121所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0597] 126.如实施方案121所述的方法，其中所述糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0598] 127.如实施方案121所述的方法，其中所述糖皮质激素为甲羟松。

[0599] 128.如实施方案120所述的方法，其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触至少约1小时的时间。

[0600] 129.如实施方案120所述的方法，其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约1小时至约24小时的时间。

[0601] 130.如实施方案120所述的方法，其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约6小时的时间。

[0602] 131.如实施方案120所述的方法，其中所述干细胞或祖细胞已与至少一种试剂接触约2小时至约4小时的时间。

[0603] 132.如实施方案120所述的方法，其中所述细胞获自骨髓、脐带血、动员的外周血、沃顿氏胶、胎盘或胎血。

[0604] 133.增加对象中的造血干细胞和祖细胞重建的方法，包括将包含细胞群的组合物给予至所述对象，所述细胞群包含人造血干细胞或祖细胞，其中：

[0605] a)所述造血干细胞或祖细胞在离体下已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触；并且

[0606] b)相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约30倍。

[0607] 134.如实施方案133所述的方法，其中相比未接触的造血干细胞或祖细胞，所述接触的造血干细胞或祖细胞的CXCR4基因表达增加为至少约40倍。

[0608] 135.如实施方案133所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括选择性结合PGE_2 EP_2或PGE_2 EP_4受体的化合物。

[0609] 136.如实施方案133所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂选自：PGE_2、$dmPGE_2$、15(S)-15-甲基PGE_2、20-乙基PGE_2和8-异-16-环己基-四去甲PGE_2。

[0610] 137.如实施方案133所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括PGE_2或者PGE_2

类似物或其衍生物。

[0611] 138.如实施方案133所述的方法，其中所述前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2。

[0612] 139.如实施方案133所述的方法，其中所述糖皮质激素选自：甲羟松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松、安西奈德、倍氯米松、二丙酸倍氟米松、倍他米松、苯甲酸倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、环索奈德、氯倍他索、丁酸氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质醇、可的松、可的伐唑、地夫可特、地奈德、去羟米松、去氧皮质酮、去氧米松、地塞米松、双氟拉松、双醋酸双氟拉松、双氟可龙、戊酸双氟可龙、二氟皮酮四醇、二氟孕甾丁酯、氟氯龙、氟氯缩松、氟氢缩松、氟米松、氟美松、特戊酸氟美松、氟尼缩松、氟尼缩松半水合物、氟轻松、氟轻松醋酸酯、醋酸氟轻松、氟可丁、丁基氟可丁、氟可龙、氟化可的松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼定、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、氟替卡松、丙酸氟替卡松、福莫可他、哈西奈德、卤米松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋丙酸氢化可的松、丁丙酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、氯替泼诺、甲泼尼松、6a-甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、醋丙酸甲基泼尼松龙、莫米松、糠酸莫米松、糠酸莫米松一水合物、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、强的松、泼尼立定、利美索龙、氢可的松、去炎松、去炎缩松和乌倍他索。

[0613] 140.如实施方案133所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触至少约1小时的时间。

[0614] 141.如实施方案133所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约6小时的时间。

[0615] 142.如实施方案133所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约2小时至约4小时的时间。

[0616] 143.如实施方案133所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞已与(i)一种或多种前列腺素通路激动剂和(ii)一种或多种糖皮质激素接触约4小时的时间。

[0617] 144.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群包含少于约0.10％、0.50％、1.0％、3％、5％、10％、15％、20％或30％的$CD34^+$细胞。

[0618] 145.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群包含至少约0.01％且不大于约50％的$CD34^+$细胞。

[0619] 146.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群包含至少约1％的$CD34^+$细胞。

[0620] 147.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群包含至少约3％的$CD34^+$细胞。

[0621] 148.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群包含至少约5％的$CD34^+$细胞。

[0622] 149.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群包含至少约90％的$CD34^+$细胞。

[0623] 150.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群包含至少约95％的$CD34^+$细胞。

[0624] 151.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群未在离体下扩增。

[0625] 152.如实施方案133所述的方法，其中所述组合物在现场即时产生，且被给予至患者而未经培养所述细胞群。

[0626] 153.如实施方案133所述的方法，其中所述组合物经过洗涤且基本上无一种或多种试剂。

[0627] 154.如实施方案133所述的方法，其中所述细胞群获自骨髓、胎肝、胎血、胎盘、胎盘血、脐带血或动员的外周血。

[0628] 155.如实施方案120或133所述的方法，其中所述细胞群包含一种或多种脐带血单元。

[0629] 156.如实施方案120或133所述的方法，其中所述对象患有急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、青少年髓单核细胞性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、严重型再生不良性贫血、范康尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、纯红细胞再生障碍、巨核细胞缺乏/先天性血小板减少症、重症复合性免疫缺陷综合征(SCID)、威斯科特-奥尔德里奇综合征、β-重型地中海贫血、镰状细胞疾病、赫尔勒综合征、肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质病变、脊髓发育不良、难治性贫血、慢性髓单核细胞白血病、特发性髓样化生、家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症或实体瘤。

[0630] 157.如实施方案120或133所述的方法，其中所述对象患有乳腺癌、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或肉瘤。

[0631] 158.如实施方案120或133所述的方法，其中所述对象已接受了骨髓消融或非清髓性化疗或放射治疗。

[0632] 159.如实施方案120或133所述的方法，其中所述对象为骨髓供体。

[0633] 160.如实施方案120或133所述的方法，其中所述细胞群为所述对象自体的。

[0634] 161.如实施方案120或133所述的方法，其中所述细胞群从所述对象的外周血或骨髓动员而来。

[0635] 162.如实施方案120或133所述的方法，其中所述细胞群对所述对象为同种异体的。

实施例

[0636] 实施例1

[0637] 处理的HSPC中的CXCR4 mRNA表达水平

[0638] 使用富鲁达平台(Fluidigm Platform)进行CXCR4 qPCR

[0639] 使用BioMark动态阵列(Dynamic Array)微流体系统(Fluidigm Corporation, South San Francisco,CA,USA)进行来自离体处理的人脐带血来源的$CD34^+$细胞的基因表达实时PCR转录物定量(Stem Cell Technologies,Vancouver,BC,Canada)。

[0640] 将来源于脐带血或动员的外周血的$CD34^+$细胞于37℃、5%CO_2下，在无血清扩增培养基(SFEM;例如，来自StemCell Technologies,Inc.的StemSpan®)中，用仅10μM前列腺素通路激动剂或与10μM糖皮质激素的组合处理4小时。前列腺素通路激动剂包括16,16-二甲基PGE_2($dmPGE_2$)、20-乙基PGE_2($ePGE_2$)、15(S)-15-甲基PGE_2($mPGE_2$)和PGE_2。糖皮质激素包括氢化可的松、地塞米松、甲羟松、阿氯米松或去炎松。处理后，用SFEM洗涤细胞，并在300g下离心10分钟。

[0641] 然后使用Pico Pure RNA分离试剂盒(Molecular Devices,Sunnyvale,CA,USA)从处理的细胞分离总RNA。使用高容量cDNA反转录试剂盒(Life Technologies Corporation, Carlsbad,CA,USA)从50ng的分离的总RNA中反转录互补DNA(cDNA)。

[0642] 使用TaqMan PreAmp Master Mix试剂盒(Life Technologies)方案，用96种基因特异性的Applied Biosystems TaqMan Assays(试剂)(参见表1)(包括3个参照对照基因

(GAPDH、HPRT1和QARS))的200nM混合物，预扩增cDNA的特定靶基因(96)。采用厂商的说明书，使用以标准循环条件进行的14个扩增循环，从cDNA进行特定靶标扩增(STA)。例如，反应混合物含有3.0μL基因表达Master Mix(Life Tech.)、0.3μL样品上样缓冲液(Fluidigm)、1.5μL稀释的(1:5无菌nH2O)STA cDNA和1.2μL无菌去离子水，以上样至96.96动态阵列(Fluidigm)的样品入口。

[0643] 样品以一式双份运行，5-9个孔。反应混合物含有2.5μL基因特异性Taqman Assay(试剂)(20X)和2.5μL Assay试剂上样缓冲液(Fluidigm)，以上样至96.96动态阵列(Fluidigm)的Assay入口。采用NanoFlex IFC控制器HX(Fluidigm)对96.96动态阵列上样，并使用BioMark实时PCR体系(Fluidigm)进行实时反应。

[0644] 使用BioMark实时PCR分析软件分析结果。从样品重复计算平均Ct，并针对仅有媒介物的样品使用3个参照基因(GAPDH、HPRT1、QARS)的均值计算Δ-ΔCt(ΔΔCt)。将大于28的Ct排出在计算之外。结果显示于Excel柱状图(Microsoft Corp.,Redmond,WA,USA)，其显示了CXCR4的平均倍数变化(2^ΔΔCt)。误差条表示重复测量的+/-标准偏差(SD)。

[0645] 结果

[0646] 观察到，相比DMSO处理的细胞，在SFEM中以10μM 16,16-二甲基PGE_2的(22倍)，或10μM $dmPGE_2$与10μM糖皮质激素的组合(50-61倍)处理的脐带血$CD34^+$细胞的CXCR4 mRNA表达增加。在10μM $dmPGE_2$和10μM的5种不同的糖皮质激素(图1)中任一种联合处理后，检测到$CXCR4^+$mRNA水平的协同增加。糖皮质激素与$dmPGE_2$协同作用来增加CXCR4基因表达。

[0647] 还观察到，相比DMSO处理的细胞，当联合糖皮质激素时，在SFEM中用其他前列腺素通路激动剂、10μM PGE2(增加为8-61倍)(图2A)、10μM 15,15-甲基PGE2(增加为16-50倍)(图2B)和10μM 20-乙基PGE2(增加为16-55倍)(图2C)将脐带血$CD34^+$细胞处理4小时，CXCR4 mRNA表达类似地协同增加。糖皮质激素还与其他前列腺素通路激动剂协同作用来增加CXCR4基因表达。

[0648] 表1:Applied Biosystems TaqMan Assay(试剂)

[0649]

基因	Assay ID	基因	Assay ID	基因	Assay ID	基因	Assay ID
ANGPT1	Hs00375822_m1	CXCL6	Hs00237017_m1	PROM1	Hs01009250_m1	BMP4	Hs00370078_m1
ANGPT2	Hs01048042_m1	IKBKB	Hs00233287_m1	PECAM1	Hs00169777_m1	TIE1	Hs00178500_m1
AREG	Hs00950669_m1	CASP3	Hs00234387_m1	JAG1	Hs01070032_m1	GAPDH	Hs99999905_m1
ARNT	Hs00231048_m1	CREM	Hs01590456_m1	CTGF	Hs00170014_m1	CD40L	Hs00163934_m1
BAX	Hs00180269_m1	HGF	Hs00300159_m1	SOD2	Hs00167309_m1	PDGFB	Hs00966522_m1
THBS1	Hs00962908_m1	DUSP4	Hs01027785_m1	CYR61	Hs00155479_m1	CXCL1	Hs00236937_m1
TEK	Hs00945146_m1	CFLAR	Hs01116280_m1	IGF2	Hs00171254_m1	CXCR4	Hs00976734_m1
MMP2	Hs01548727_m1	FGF2	Hs00266645_m1	PTGS2	Hs00153133_m1	RAC2	Hs01032884_m1
PDGFR	Hs01019589_m1	NR4A2	Hs00428691_m1	TERT	Hs00972656_m1	TGFB1	Hs00998133_m1
MMP9	Hs00234579_m1	CD40	Hs00374176_m1	CD44	Hs01075861_m1	HMGB1	Hs01923466_g1
NOS3	Hs01574659_m1	KDR	Hs00911700_m1	ITGB1	Hs00559595_m1	CTNNB1	Hs00170025_m1
CSF3	Hs00357085_g1	IL8	Hs00174103_m1	PLAUR	Hs00182181_m1	DUSP4	Hs00175210_m1
BCL2	Hs00608023_m1	BMP2	Hs00154192_m1	CSF1	Hs00174164_m1	AKT1	Hs00178289_m1
VEGFA	Hs00900055_m1	ICAM1	Hs00164932_m1	CXCL3	Hs00171061_m1	CASP8	Hs01018151_m1
CD34	Hs00990732_m1	IL1A	Hs00174092_m1	CD47	Hs00179953_m1	CCL7	Hs00171147_m1

[0650]

HIF1A	Hs00936371_m1	EDN1	Hs00174961_m1	S1PR1	Hs00173499_m1	CCR1	Hs00174298_m1
SMAD	Hs00929647_m1	FLT1	Hs01052961_m1	GEM	Hs00738924_m1	CD151	Hs00388381_m1
PGF	Hs01119262_m1	NFKB1	Hs00765730_m1	SMAD2	Hs00183425_m1	CXCR7	Hs00604567_m1
TGFB3	Hs01086000_m1	CXCL5	Hs00171085_m1	CCND1	Hs00765553_m1	HBEGF	Hs00181813_m1
NR3C1	Hs00353740_m1	TNF	Hs00174128_m1	ITGAL	Hs00158218_m1	CXCR2	Hs01011557_m1
STAT1	Hs01013996_m1	ITGA4	Hs00168433_m1	LIF	Hs00171455_m1	RASA1	Hs00243115_m1
CDH5	Hs00901463_m1	HPRT1	Hs01003267_m1	EFNB2	Hs00187950_m1	RGS16	Hs00161399_m1
CXCL2	Hs00601975_m1	ITGA5	Hs01547673_m1	CXCL12	Hs00171022_m1	TIMP1	Hs00171558_m1
FOSL2	Hs00232013_m1	ITGB2	Hs00164957_m1	QARS	Hs00192530_m1	TIMP2	Hs00234278_m1

[0651] 使用Applied Biosystems StepOnePlus进行CXCR4 qPCR

[0652] 使用Applied Biosystems StepOne Plus体系(Life Technologies Corporation,Carlsbad,CA,USA)进行来自离体处理的脐带血$CD34^+$细胞(Stem Cell Technologies,Vancouver,BC,Canada)和动员的外周血$CD34^+$细胞(All Cells,LLC,Emoryville,CA,USA)的转录物定量实时PCR(参见图3)。于37℃、5%CO_2下,在SFEM中,用仅10μM 16,16-二甲基PGE_2($dmPGE_2$)或与10μM甲羟松的组合将$CD34^+$细胞处理4小时。处理后,用SFEM洗涤细胞,并在300g下离心10分钟。

[0653] 然后,使用Pico Pure RNA分离试剂盒(Molecular Devices,Sunnyvale,CA,USA),从处理的细胞中分离总RNA。使用高容量cDNA反转录试剂盒(Life Technologies),从50ng分离的总RNA中反转录互补DNA(cDNA)。

[0654] 以一式双份对cDNA样品运行实时PCR分析。反应混合物含有1μL基因特异性Taqman Assay(20X)和10μL基因表达Master Mix(Life Technologies),剩下的9μL体积含有10ng cDNA和无菌去离子水。

[0655] 使用Applied Biosystems StepOne软件v2.1分析软件分析CXCR4结果(Assay试剂来自表1)。从样品重复计算平均Ct,并针对仅有媒介物的样品使用GAPDH结果(Assay试剂来

自表1)作为参照基因计算Δ-ΔCt(ΔΔCt)。将大于28的Ct排出在计算之外。结果显示于Excel柱状图(Microsoft Corp.,Redmond,WA,USA),其显示了CXCR4的平均倍数变化(2^ΔΔCt)。误差条表示重复测量的+/-标准偏差(SD)(参见图1-3、5和6)。

[0656] 结果

[0657] 于SFEM中用10μM 16,16-二甲基PGE_2处理4小时后,在脐带血来源的$CD34^+$细胞和分离自动员的外周血的$CD34^+$细胞(分别增加为22和27倍)中均观察到CXCR4 mRNA表达类似的增加。于SFEM中用前列腺素通路激动剂(dmPGE2)和糖皮质激素(甲羟松)联合处理4小时后,在脐带血来源的$CD34^+$细胞和$CD34^+$细胞分离自动员的外周血(分别为60和59倍)中均检测到CXCR4 mRNA类似的协同增加(图3)。$CD34^+$细胞对每种处理反应相似,而与来源无关。

[0658] 实施例2

[0659] 用DMPGE2与甲羟松的组合处理$CD34^+$细胞引起CXCR4表面蛋白表达增加

[0660] 对冷冻的$CD34^+$CB和PB进行CXCR4表面表达分析

[0661] 于37℃、5%CO_2下,在SFEM中,用10μM $dmPGE_2$、$dmPGE_2$和甲羟松或者DMSO(作为对照)将$CD34^+$脐带血(CB)细胞(Stem Cell Technologies)和$CD34^+$动员的外周血(mPB)细胞(所有细胞)处理2和4小时。处理后,用SFEM洗涤细胞,并在300g下离心10分钟。然后将细胞悬浮在SFEM中,以用于在37℃、5%CO_2下孵育不同的时间。

[0662] 在SFEM中,用$dmPGE_2$、$dmPGE_2$和甲羟松或者DMSO将mPB和CB $CD34^+$细胞处理2或4小时,然后在处理期间和之后的不同时间点分析细胞的CXCR4表面蛋白表达(表2)。为了测量CXCR4水平,将处理的细胞在300g下离心10分钟,然后悬浮在含有谱系(Lineage)混合物1-FITC、CD34-APC、CXCR4(CD184)-PE的染色介质中,并在冰上孵育20分钟。然后将新鲜的染色介质加入细胞中,洗涤细胞以与任何残留的未结合抗体分离,将细胞在300g下离心10分钟,并重复该洗涤步骤两次。将染色的细胞捕获在Guava EasyCyte 8HT流式细胞仪上,并使用FloJo软件包(Treestar)进行分析。

[0663] 表2.用于CXCR4蛋白表面分析的处理和时间点

[0664]

时间	测量		
2 h Tx	DMSO	10μM dmPGE2	10μM dmPGE2 +

[0665]

2 h Tx+ 2h，37°C			10μM 甲羟松
2 h Tx+ 4h，37° C			
4 h Tx			
4 h Tx+ 2h，37° C			
4 h Tx+ 4h，37° C			

[0666] 结果

[0667] 观察到,相比DMSO处理的细胞,来自37℃下,在SFEM中以10μM16,16-二甲基PGE_2和$dmPGE_2$与甲羟松处理2和4小时的脐带血或mPB细胞的$CD34^+$细胞的CXCR4 RNA表达增加。对于两种类型的细胞而不管细胞来源,在用$dmPGE_2$和甲羟松处理4小时后的2小时得到了$CXCR4^+$细胞的最高百分比(图5和6)。对于动员的外周血$CD34^+$细胞,75%的细胞表达$CXCR4^+$,相比较

而言对照为8%(图5)。对于脐带血$CD34^+$细胞,25%的细胞在$dmPGE_2$及甲羟松处理后表达CXCR4,相比较而言对照样品为3-6%(图6)。

[0668] 还测试了来自人骨髓的$CD34^+$细胞响应16,16-二甲基PGE_2以及$dmPGE_2$与甲羟松的组合的能力。其中,于37℃下、在SFEM中,用10μM16,16-二甲基PGE2+10μM甲羟松将预先冷冻的骨髓$CD34^+$处理4小时。然后洗涤细胞并悬浮在SFEM中2小时。然后通过流式细胞术按先前所述评估CXCR4表面蛋白。在SFEM中用仅10μM 16,16-二甲基PGE_2或10μM 16,16-二甲基PGE_2+10μM甲羟松处理BM $CD34^+$细胞,使得CXCR4蛋白表达水平分别增加为12和20倍。此外,在SFEM中用10μM16,16-二甲基PGE_2+10μM甲羟松处理使得$CXCR4^+$细胞百分比增加12倍(图4A和4B)。

[0669] 实施例3

[0670] SDF-1Transwell迁移测定

[0671] 方法

[0672] 根据厂商说明书,使用96孔趋化性小室、5μM孔径聚碳酸酯膜(Corning Inc.,Corning,NY)进行Transwell迁移测定。简而言之,在StemSpan®培养基(Stem Cell Technology,Vancouver,Canada)中,将$CD34^+$细胞于37℃下以10μM浓度的16,16-二甲基PGE_2($dmPGE_2$)、$dmPGE_2$和糖皮质激素或者DMSO对照处理4小时。然后通过离心洗涤细胞(300x g,进行10分钟),并以40,000-60,000个细胞/75μl的浓度悬浮在Transwell检测缓冲液(Phenol Red Free RPMI培养基(Mediatech)、0.5%无脂质BSA(Sigma-Aldrich)中。

[0673] 为了测试处理效应的持续时间,通过离心(300x g,进行10分钟)来洗涤一部分的处理细胞,并于37℃悬浮在无$dmPGE_2$、糖皮质激素或DMSO的StemSpan®培养基中4小时,然后通过离心(300x g,进行10分钟)再次洗涤,并以40,000-60,000个细胞/75μl的浓度悬浮在Transwell检测缓冲液(Phenol Red Free RPMI培养基(Mediatech)、0.5%无脂质BSA(Sigma-Aldrich)中。

[0674] 将75μl的细胞悬液加入板的上层小室中,而将235μl含0或50ng/ml SDF1α(R&D system,Minneapolis,MN)的transwell检测培养基加入底层孔中。于37℃、5%CO_2下孵育2.5小时后,通过流式细胞术获取下层孔中的总细胞数。

[0675] 结果

[0676] 按上文所述,用DMSO对照、$dmPGE_2$或$dmPGE_2$及甲羟松处理$CD34^+$细胞。将处理的细胞放置在Transwell培养板的上层小室中,而下层小室具有0ng/mL或50ng/mL的SDF1。迁移被表示为加入的细胞%,即下层小室中的细胞数标准化为最初加入上层小室中的细胞数。相比DMSO对照,$dmPGE_2$处理增加了SDF1驱动的迁移(参见图7)。$dmPGE_2$与甲羟松联合处理所增加的SDF1驱动的细胞迁移,大于仅$dmPGE_2$或DMSO对照(参见图7)。因此,相比DMSO对照处理的细胞,在SFEM中用$dmPGE_2$或$dmPGE_2$及甲羟松处理的$CD34^+$细胞向SDF1的迁移更为有效。

[0677] 按上文所述,用DMSO对照、$dmPGE_2$或$dmPGE_2$及糖皮质激素(甲羟松、氢化可的松、去炎松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松或地塞米松)处理$CD34^+$细胞。将处理的细胞放置在Transwell培养板的上层小室中,而下层小室具有0ng/mL或50ng/mL的SDF1。迁移被表示为加入的细胞%,即下层小室中的细胞数标准化为最初加入上层小室中的细胞数。相比DMSO对照,$dmPGE_2$处理增加了SDF1驱动的细胞迁移(参见图8)。此外,相比仅$dmPGE_2$或DMSO对照,

用dmPGE$_2$组合甲羟松、氢化可的松、去炎松、阿氯米松、二丙酸阿氯米松或地塞米松处理所增加的SDF1驱动的细胞迁移更为有效(参见图8)。因此,相比DMSO对照处理的细胞,在SFEM中用dmPGE2或dmPGE2及各种糖皮质激素处理的CD34$^+$细胞向SDF1的迁移更为有效,并且表明前列腺素通路激动剂/糖皮质激素处理的细胞的增强的迁移性,不限于特定糖皮质激素。

[0678] 检测了dmPGE$_2$/糖皮质激素处理的细胞向SDF-1的增强的迁移效应的持续时间。用DMSO或dmPGE$_2$及甲羟松处理CD34$^+$细胞。将新鲜处理的细胞或处理的细胞再孵育4小时而不进行进一步处理(如上所述),并将其放置在Transwell培养板的上层小室中,而下层小室具有0ng/mL或50ng/mL的SDF-1。迁移被表示为加入的细胞%,即下层小室中的细胞数标准化为最初加入上层小室中的细胞数。相比DMSO对照,dmPGE$_2$与甲羟松处理增加了SDF1驱动的细胞迁移(参见图9)。此外,将dmPGE$_2$与甲羟松处理的细胞再孵育4小时而不进行进一步的处理,且其发生了迁移,新鲜处理的细胞也发生了迁移。因此,前列腺素通路激动剂/糖皮质激素处理的细胞向SDF-1的增强的迁移效果可稳定至少4小时,表明将处理的细胞给予至对象也会存在效应。

[0679] 实施例4

[0680] PGE2与PGE2/糖皮质激素处理的CD34$^+$细胞改善了大鼠缺血模型的神经和运动功能

[0681] 方法

[0682] 通过封阻右侧大脑中动脉MCAO模型(大脑中动脉闭塞),使成年雄性Wistar大鼠经受短暂的病灶性缺血。将带有圆形尖端的外科尼龙缝合线从颈外动脉推入颈内动脉内腔中,直到其堵住大脑中动脉起点。2小时后,收回缝合线以允许再灌注。再灌注后一天,经尾静脉向大鼠注射Hanks平衡盐溶液(HBSS)、以DMSO处理的CD34$^+$细胞或以dmPGE2和甲羟松处理的CD34$^+$细胞。还注入了磷酸二酯酶4型抑制剂(YM976)以增加增强的细胞效应的持续时间。我们的工作证明,PDE4抑制剂未显著改变增强的细胞的性能。在培养基中将细胞于37℃用化合物或DMSO孵育4小时。注射前,离心预处理的细胞;抽出所得的上清液;并将细胞团悬浮在HBSS中。

[0683] 在注射后1天和1、2、3、4和5周,利用由不了解实验组的研究者进行行为测试以评估大鼠的神经功能缺陷。基于公开的运动、感觉、平衡和反射检测图(panel)计算改良的神经功能缺损评分(mNSS)(Chen et al.,Stroke 32:2682-2688(2001))。

[0684] 另外,在注射后1天和1、2、3、4和5周,利用脚误检测评估了处理的大鼠的运动功能,其中动物穿过了有孔的通道。测定了前肢步伐总数和失足数,其中左前肢失足穿孔。

[0685] 结果

[0686] 将处理过的HSPC给予至大鼠,并检测了MCAO中风模型中处理影响神经功能缺损减少的能力。在单边缺血性脑损伤后24小时,经静脉注射处理过的HSPC。利用一连串的行为检测评估了神经功能,并汇报为mNSS。相比媒介物对照,以dmPGE$_2$和甲羟松处理的细胞在第7、14和35天显著改善了mNSS,而DMSO处理的细胞未显著影响mNSS(参见图10)。*$p<0.05$(n=6只/组)。

[0687] 将以dmPGE$_2$和甲羟松处理的HSPC给予至大鼠,并检测了MCAO中风模型中处理影响运动损伤减少的能力。在单边缺血性脑损伤后24小时,经静脉注射处理过的HSPC。运动功能评估为穿过有孔的通道时出现的%脚误。相比媒介物对照,以dmPGE$_2$和甲羟松处理的细胞

在第7和35天显著减少了％脚误，而DMSO处理的细胞未显著影响％脚误(参见图11)。*p<0.05(n＝6/组)。

[0688] 因此，以前列腺素通路拮抗剂和糖皮质激素处理的HSPC有效治疗了大鼠MCAO模型的局部缺血以及与其相关的症状。

[0689] 实施例5

[0690] 方法

[0691] 来自处理的全脐带血的Lin(-)CD34$^+$细胞的分离

[0692] 人全脐带血单核细胞获自Stem Cell Technologies(Vancouver,Canada)。解冻后，在LMD/5％HAS培养基中，用16,16-二甲基PGE_2或合适的对照如DMSO处理细胞。

[0693] 处理后，用LMD/5％HAS培养基洗涤细胞，于室温下以650x g离心10分钟，并重悬于冷的选择缓冲液(磷酸盐缓冲盐水(PBS)，无Ca^+或Mg^+;2mM EDTA;以及0.5％HSA)。

[0694] 使用谱系消耗(Lineage(Lin)Depletion)试剂盒(Miltenyi Biotec,CA)以及随后的CD34$^+$富集试剂盒(Miltenyi Biotec)进行磁性选择。根据厂商说明书使用QuadroMACS™分离器进行谱系消耗和CD34$^+$细胞富集。在该过程中，将细胞保存在4℃。一旦从处理的全脐带血中分离出Lin-CD34$^+$细胞，即通过流式细胞术分析小份试样，以评估纯度。细胞纯度大于90％。大多数的细胞被用于使用Pico Pure RNA分离试剂盒(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)进行RNA提取，以用于Affymetrix分析。

[0695] 如上所述，以上实施例中描述的CD34$^+$细胞分离自脐带血、动员的外周血和骨髓细胞，并且获自Stem Cell Technologies和All Cells LLC。在收到这些细胞后，基于CD34$^+$细胞表面上存在的谱系标记的量，通过流式细胞术测定了已分化细胞的污染水平。表达谱系标记的CD34$^+$细胞为分化的祖细胞，其具有与谱系阴性CD34$^+$细胞不同的自我更新能力。获自这些公司的和本文实验中提及的所有CD34$^+$细胞均为至少85％的CD34$^+$/Lin(-)细胞。

[0696] 可将上述的各种实施方案组合以提供其他的实施方案。本说明书中提及的和/或申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文中。如果需要采用不同专利、申请和出版物的构想以提供其他的实施方案，可对实施方案的方面进行修改。

[0697] 可以根据上述详细描述的说明，对实施方案进行这些和其他的改变。一般而言，在所附的权利要求中，所用的术语不应当理解为将权利要求限制为说明书和权利要求书中公开的具体实施方案，而应当理解为包括所有可能的实施方案，以及此类权利要求所享有的等效物的全部范围。因此，本权利要求书不受本公开的限制。

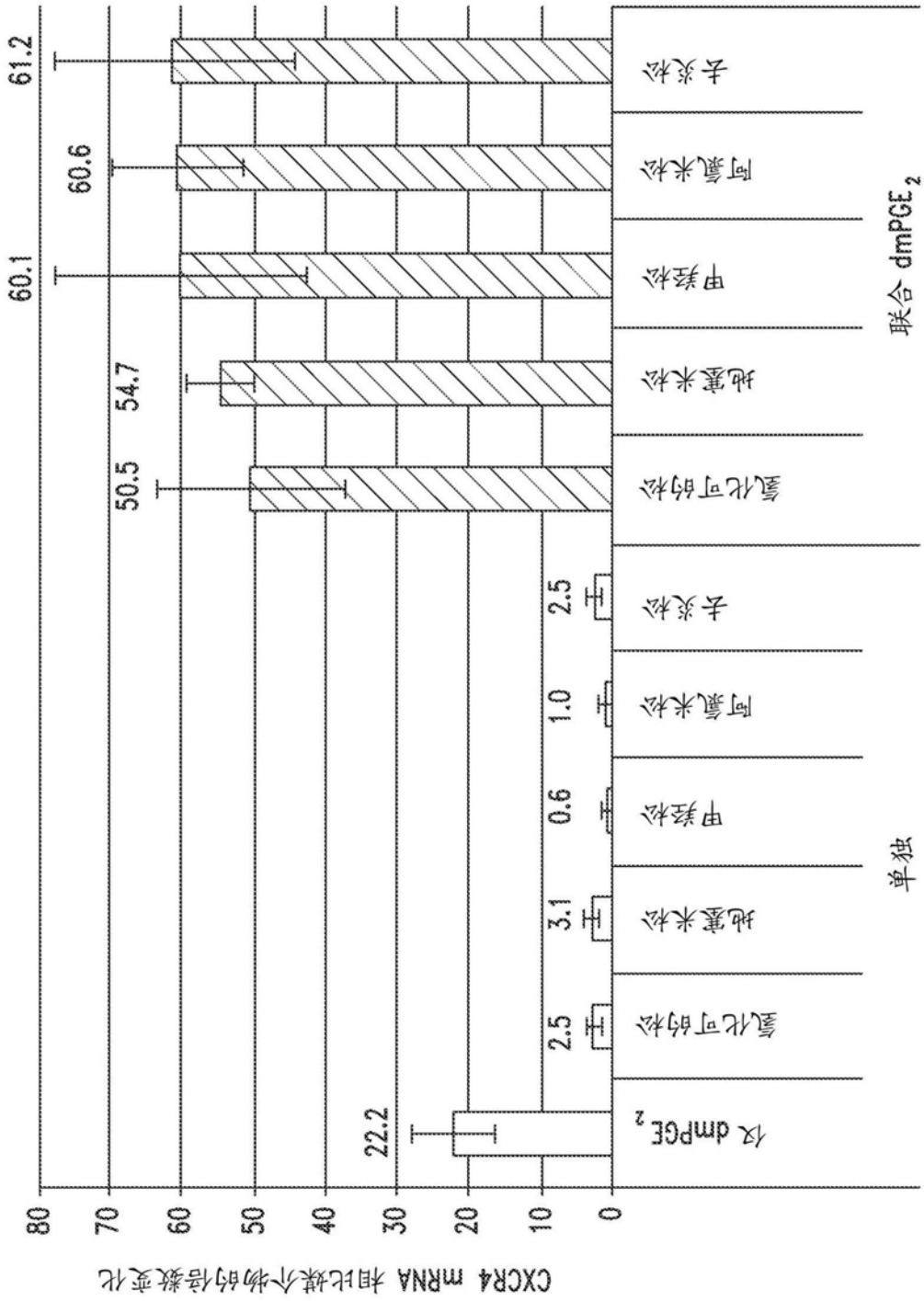

CXCR4 mRNA 相比媒介物的倍数变化
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1X dmPGE2
22.2
氢化可的松
2.5
地塞米松
3.1
甲羟松
0.6
阿氯米松
1.0
去炎松
2.5
氢化可的松
50.5
地塞米松
54.7
甲羟松
60.1
阿氯米松
60.6
去炎松
61.2
单独
联合 dmPGE2

图1

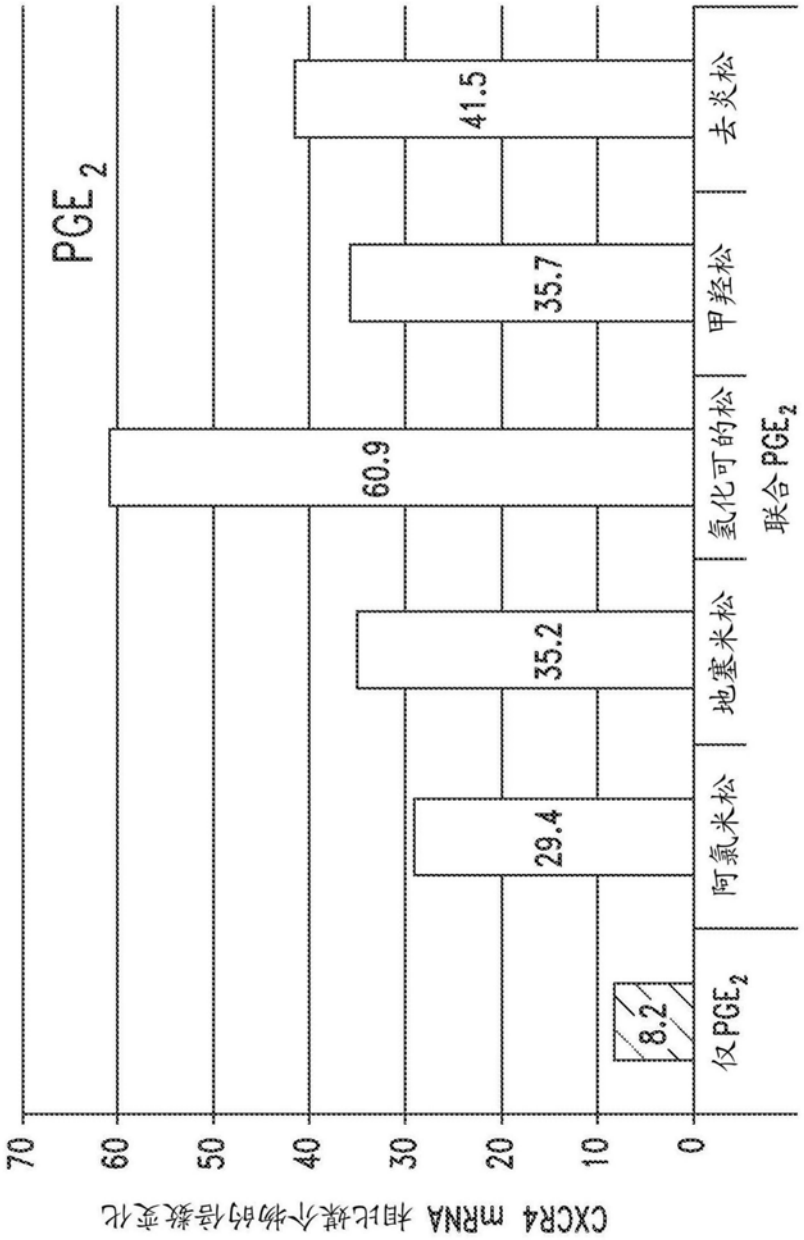

PGE 2
CXCR4 mRNA 相比媒介物的倍数变化
70
60
50
40
30
20
10
0
8.2
29.4
35.2
60.9
35.7
41.5
仅PGE2
阿氯米松
地塞米松
氢化可的松
甲羟松
去炎松
联合PGE2

图2A

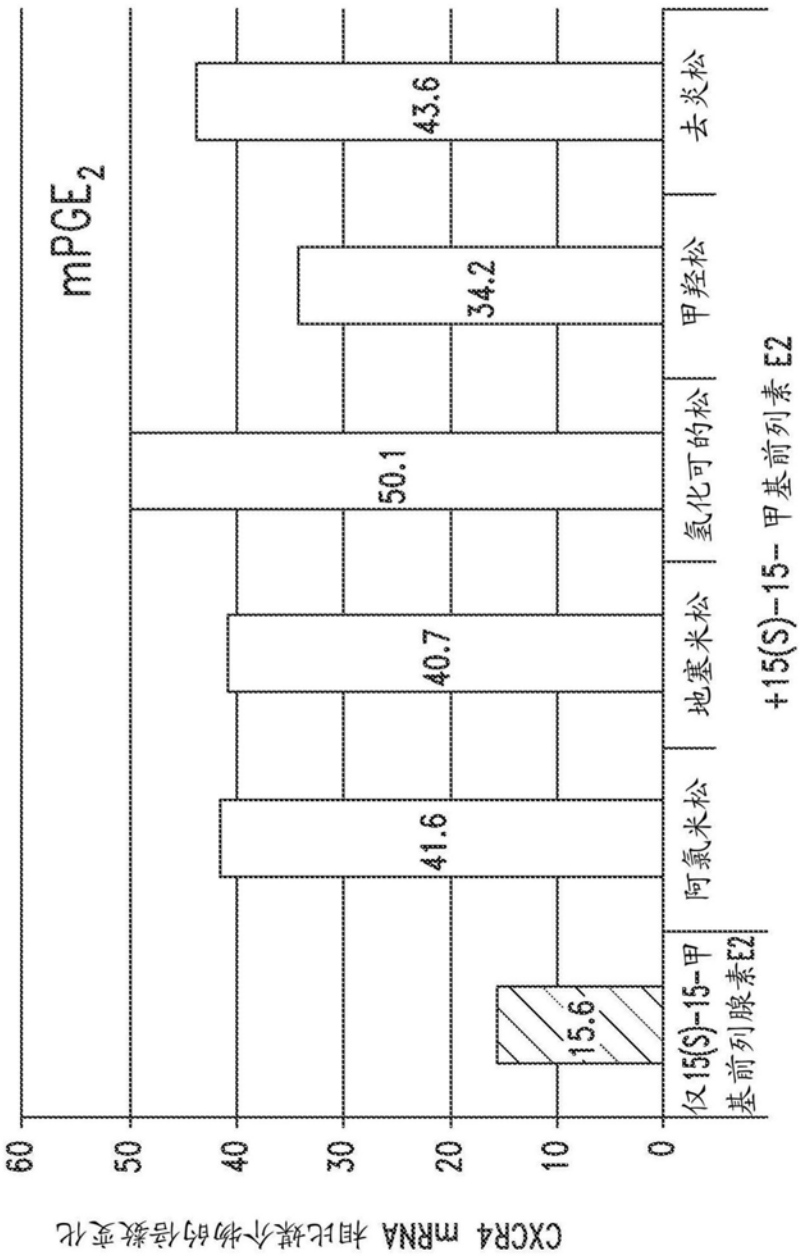

mPGE2
CXCR4 mRNA 相比媒介物的倍数变化
60
50
40
30
20
10
0
15.6
41.6
40.7
50.1
34.2
43.6
仅15(S)-15-甲基前列腺素E2
阿氣米松
地塞米松
氢化可的松
甲羟松
去炎松
+15(S)-15- 甲基前列素 E2

图2B

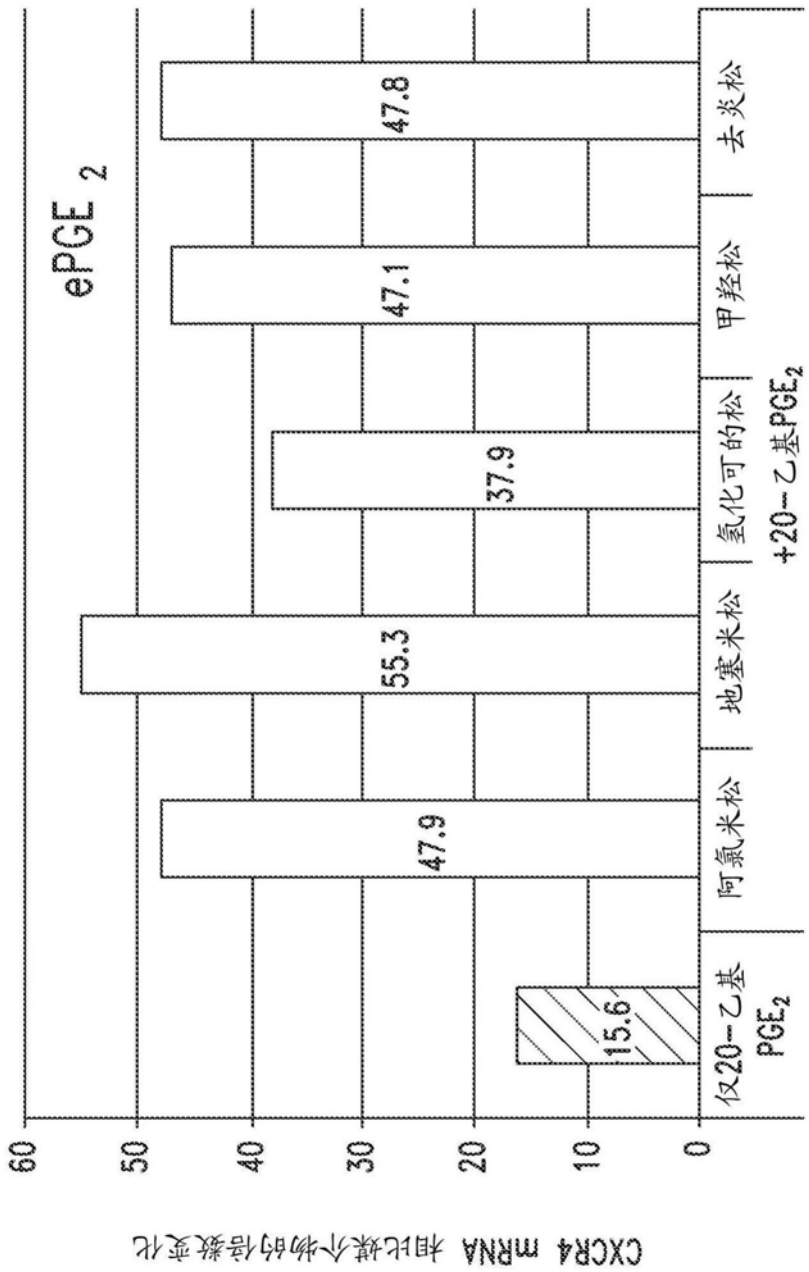

CXCR4 mRNA 相比媒介物的倍数变化
60
50
40
30
20
10
0
ePGE 2
15.6
47.9
55.3
37.9
47.1
47.8
仅20-乙基 PGE2
阿氯米松
地塞米松
氢化可的松
甲羟松
去炎松
+20-乙基PGE2

图2C

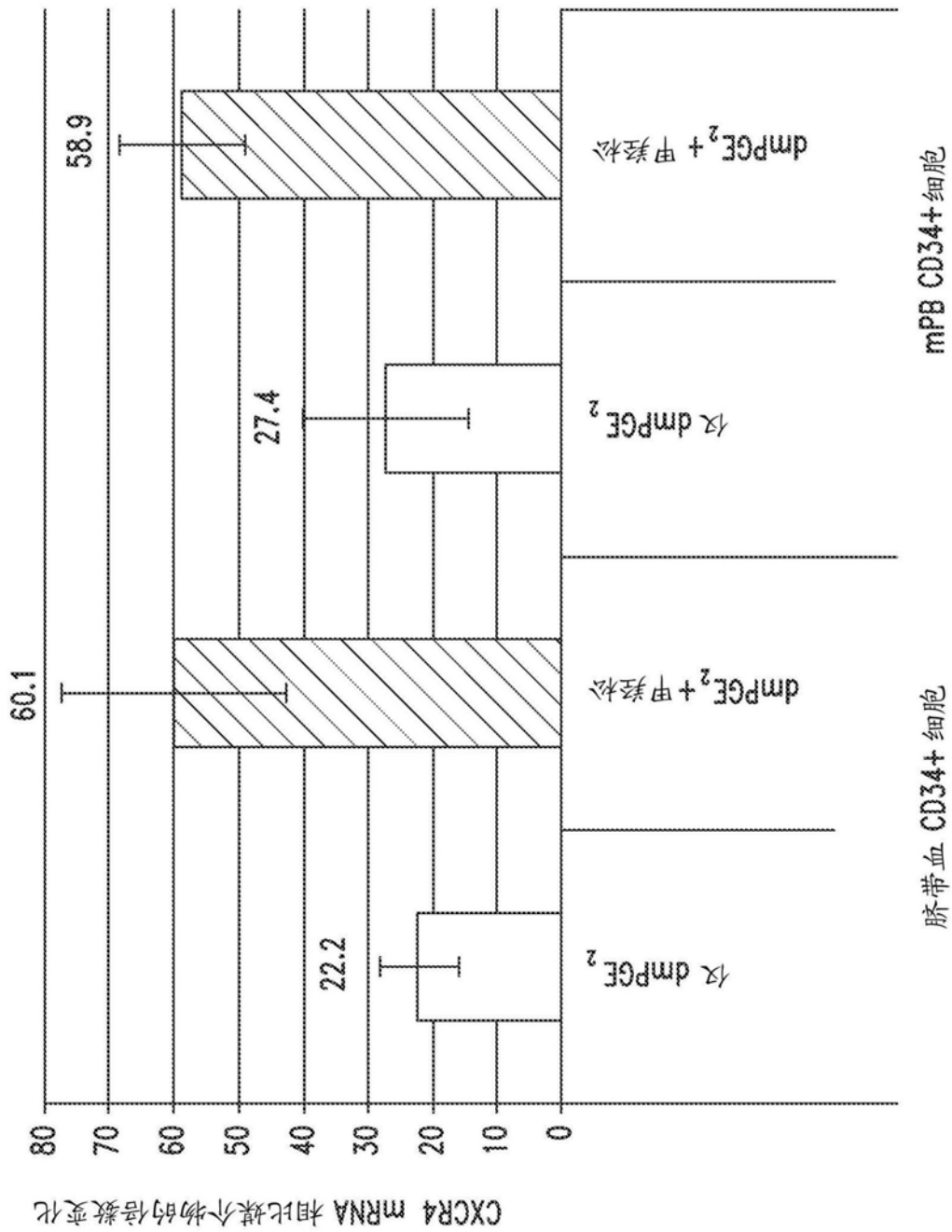

CXCR4 mRNA 相比媒介物的倍数变化
80
70
60
50
40
30
20
10
0
60.1
22.2
27.4
58.9
1X dmPGE2
dmPGE2+甲羟松
1X dmPGE2
dmPGE2+甲羟松
脐带血 CD34+细胞
mPB CD34+细胞

图3

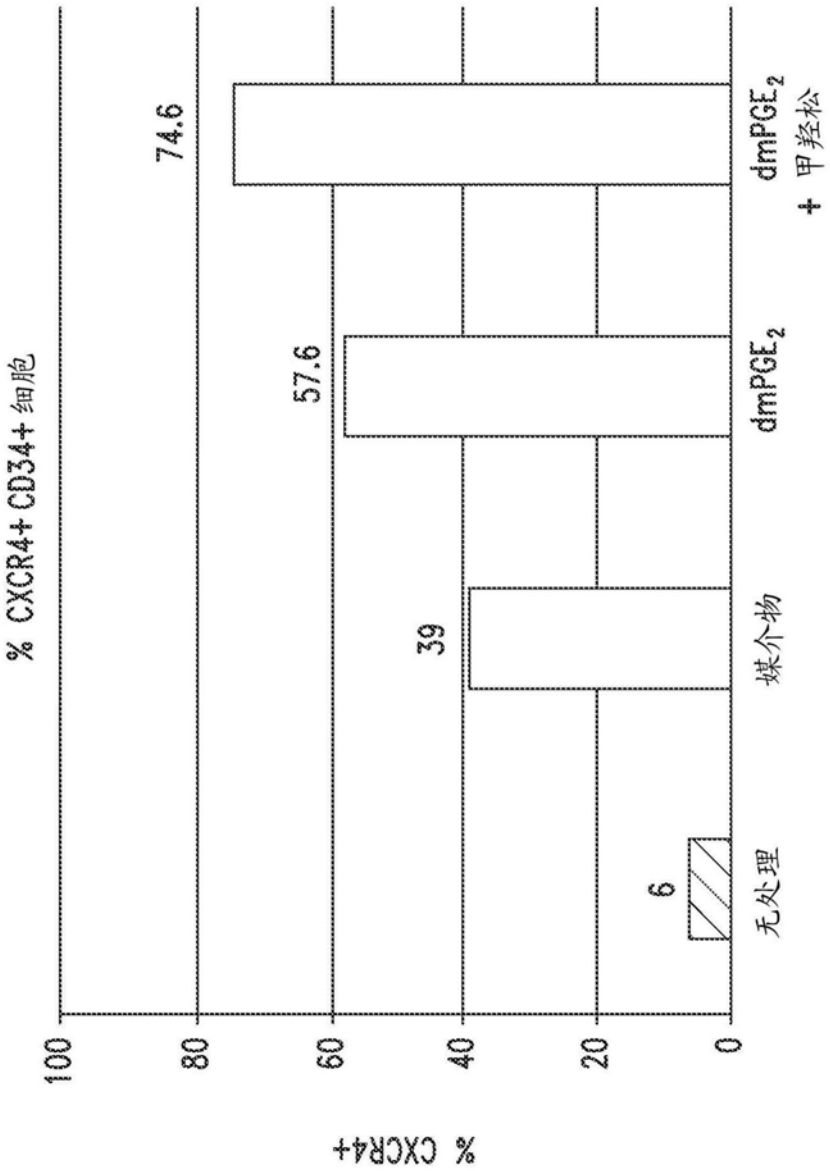

% CXCR4+ CD34+ 细胞
100
80
60
40
20
0
% CXCR4+
6
39
57.6
74.6
无处理
媒介物
dmPGE2
dmPGE2 + 甲羟松

图4A

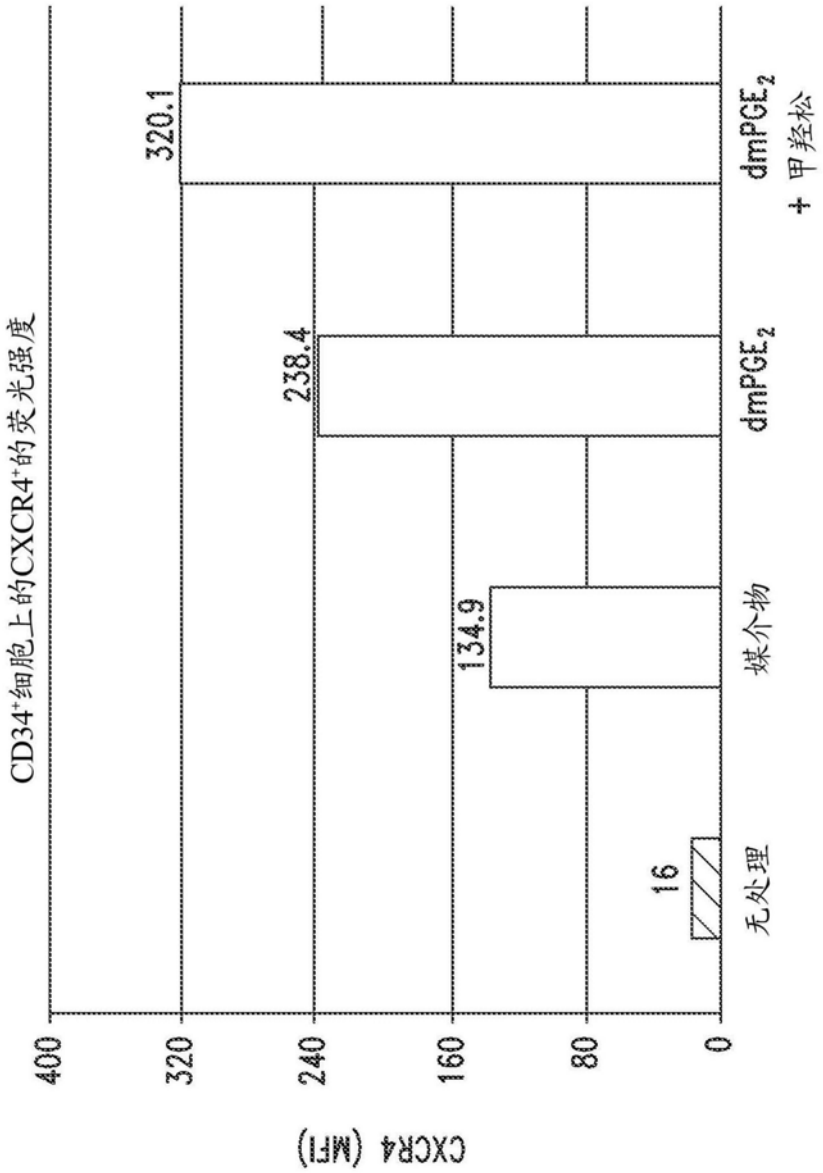

CD34⁺细胞上的CXCR4⁺的荧光强度
CXCR4 (MFI)
400
320
240
160
80
0
16
134.9
238.4
320.1
无处理
媒介物
dmPGE2
dmPGE2 + 甲孕松

图4B

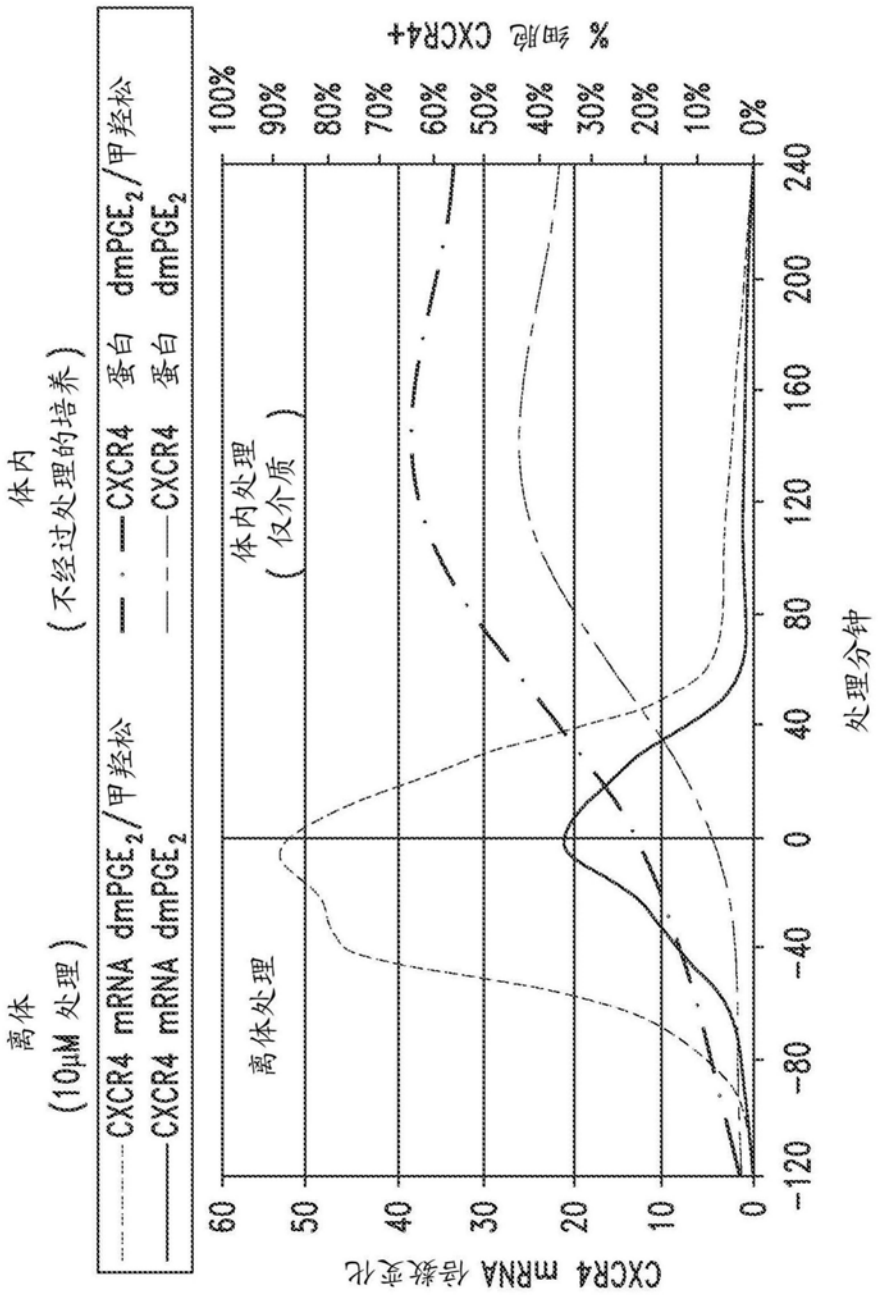

离体
(10μM 处理)
CXCR4 mRNA dmPGE2/甲羟松
CXCR4 mRNA dmPGE2
体内
(不经过处理的培养)
CXCR4 蛋白 dmPGE2/甲羟松
CXCR4 蛋白 dmPGE2
离体处理
体内处理
(仅介质)
CXCR4 mRNA 倍数变化
% 细胞 CXCR4+
处理分钟
60
50
40
30
20
10
0
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
-120
-80
-40
0
40
80
120
160
200
240

图5

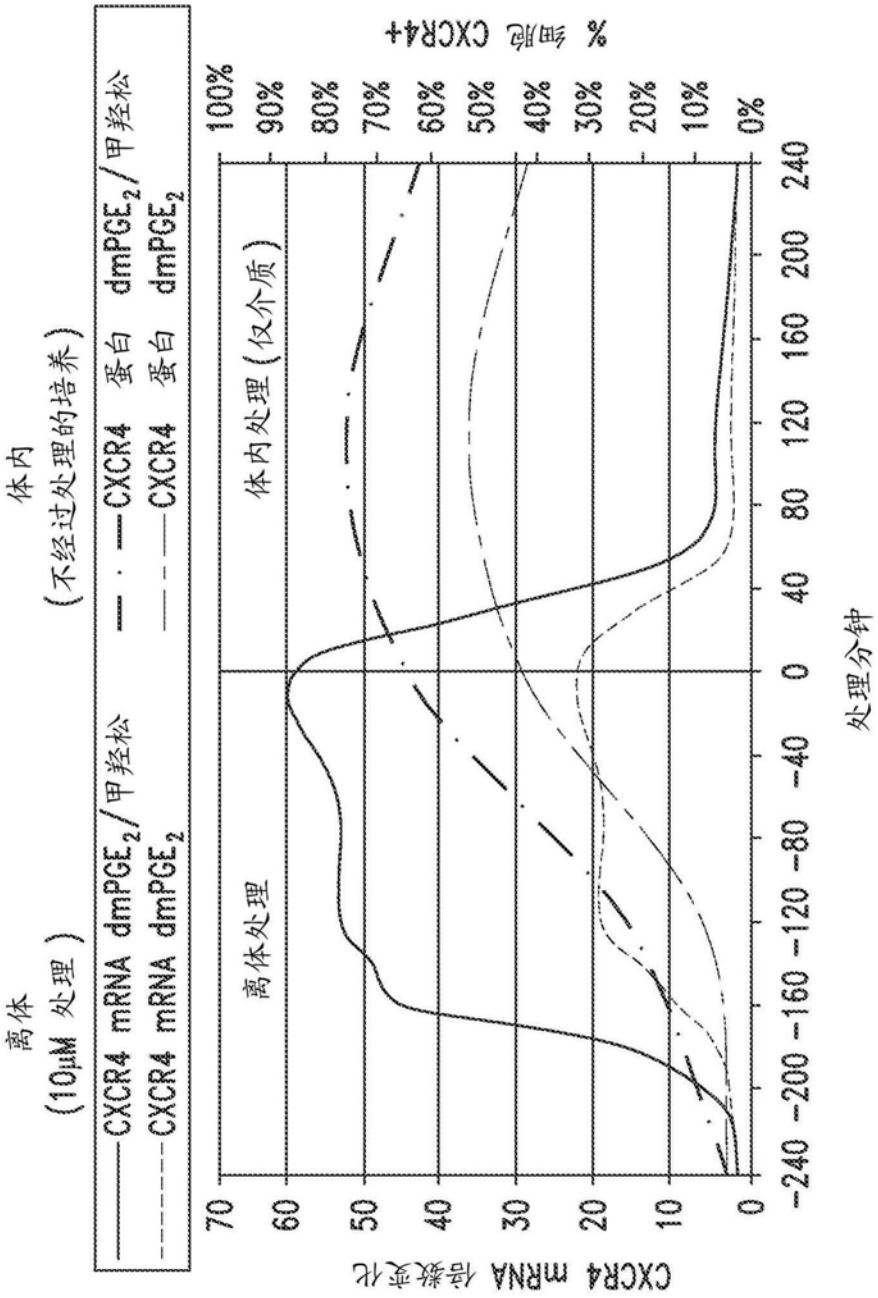

离体
(10μM 处理)
CXCR4 mRNA dmPGE2/甲羟松
CXCR4 mRNA dmPGE2
体内
(不经过处理的培养)
CXCR4 蛋白 dmPGE2/甲羟松
CXCR4 蛋白 dmPGE2
离体处理
体内处理(仅介质)
CXCR4 mRNA 倍数变化
% 细胞 CXCR4+
处理分钟
70
60
50
40
30
20
10
0
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
-240 -200 -160 -120 -80 -40 0 40 80 120 160 200 240

图6

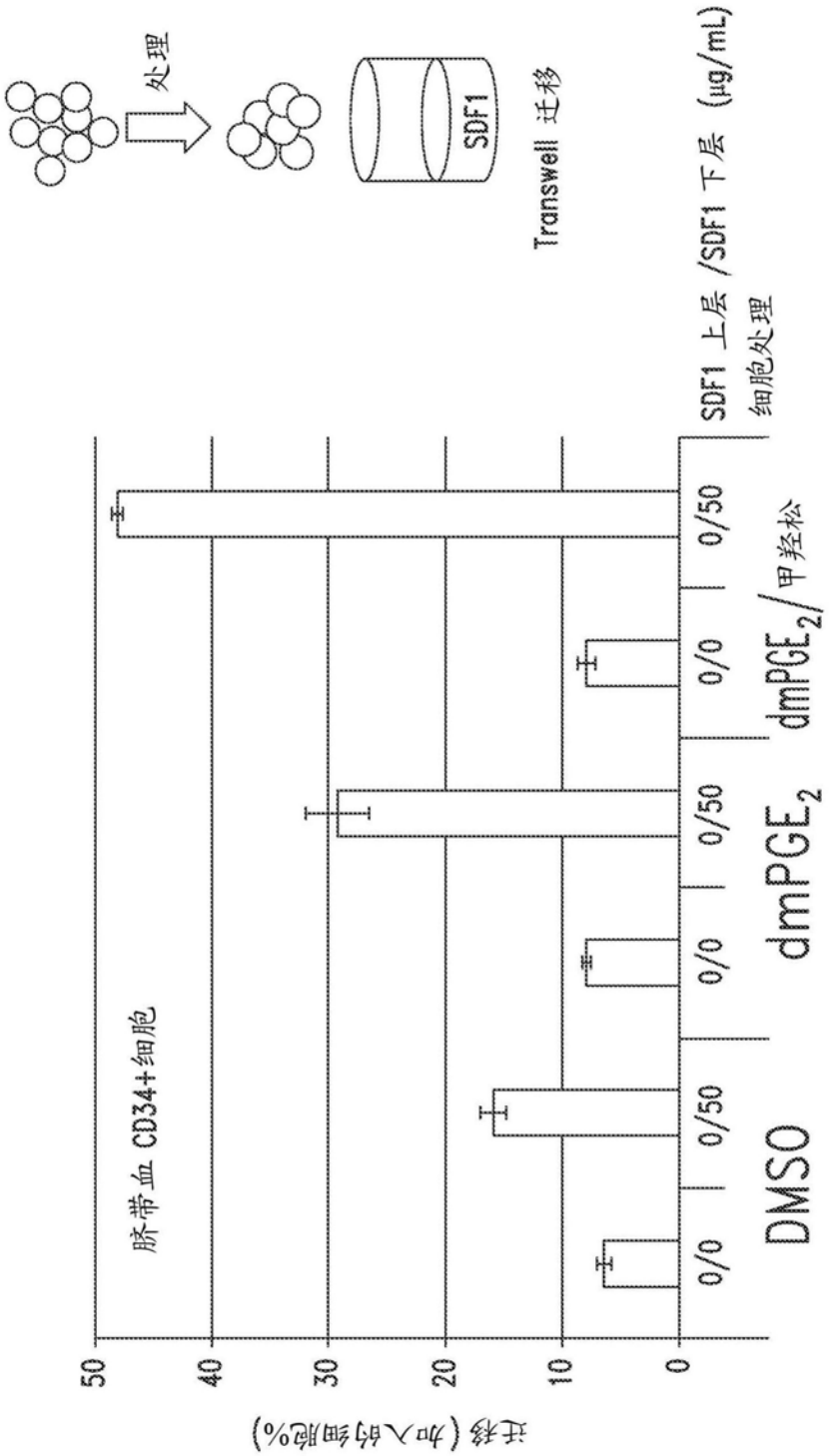

处理
SDF1
Transwell 迁移
SDF1 上层 /SDF1 下层 (μg/mL)
细胞处理
脐带血 CD34+细胞
迁移 (加入的细胞%)
50
40
30
20
10
0
0/0
0/50
0/0
0/50
0/0
0/50
DMSO
dmPGE2
dmPGE2/甲羟松

图7

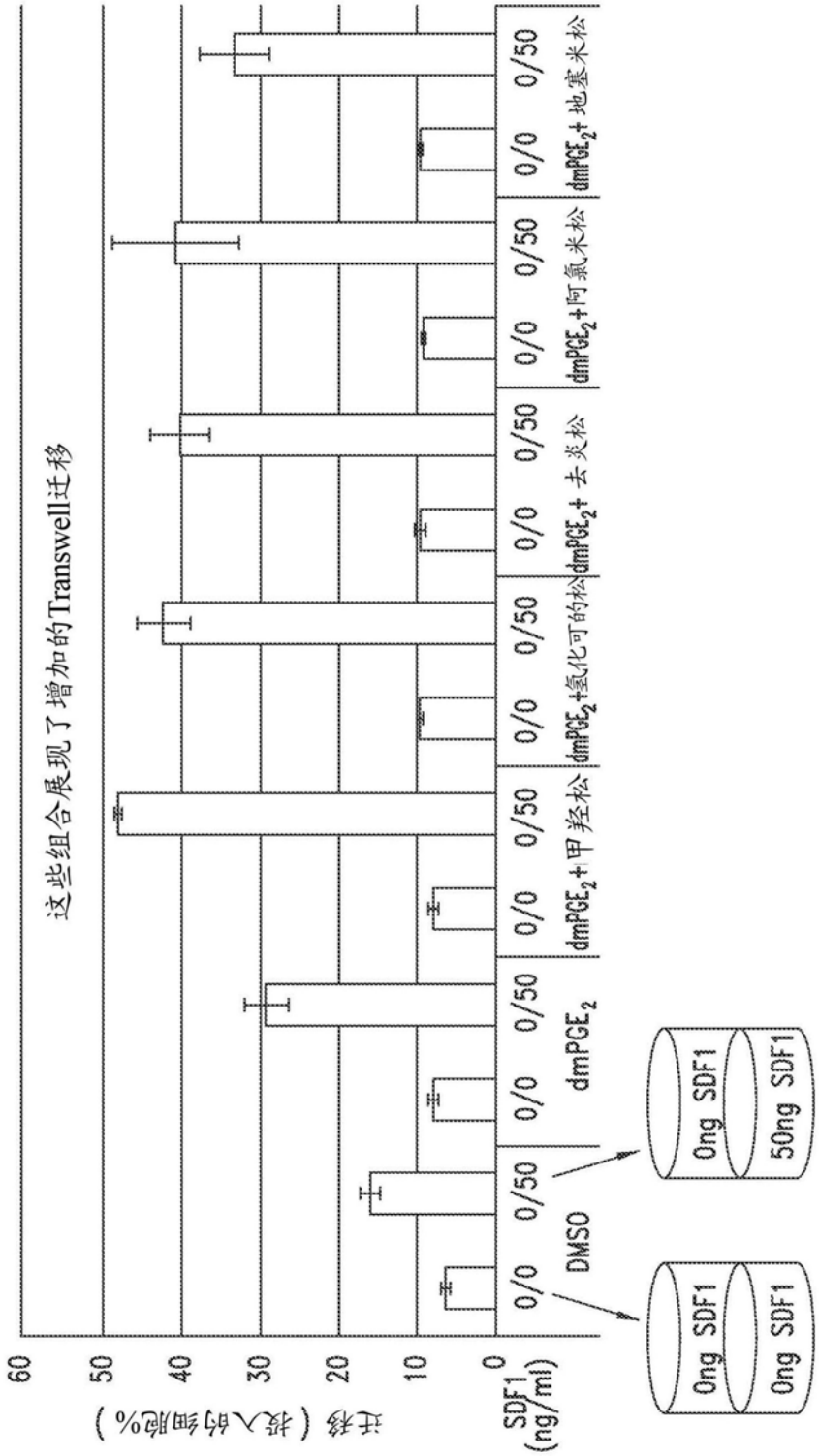
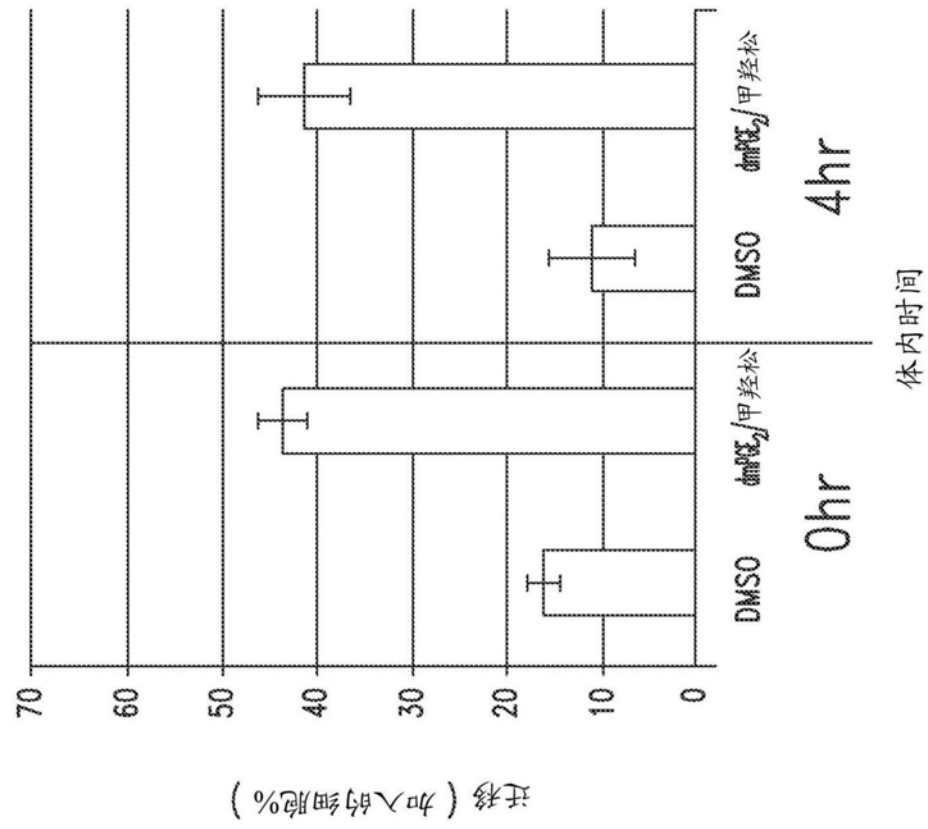

这些组合展现了增加的Transwell迁移
迁移（投入的细胞%）
60
50
40
30
20
10
0
SDF1 (ng/ml)
0/0
0/50
DMSO
dmPGE2
dmPGE2+甲羟松
dmPGE2+氢化可的松
dmPGE2+ 去炎松
dmPGE2+阿氯米松
dmPGE2+地塞米松
0ng SDF1
50ng SDF1

图8


迁移（加入的细胞%）
70
60
50
40
30
20
10
0
DMSO
dmPGE2/甲羟松
DMSO
dmPGE2/甲羟松
0hr
4hr
体内时间

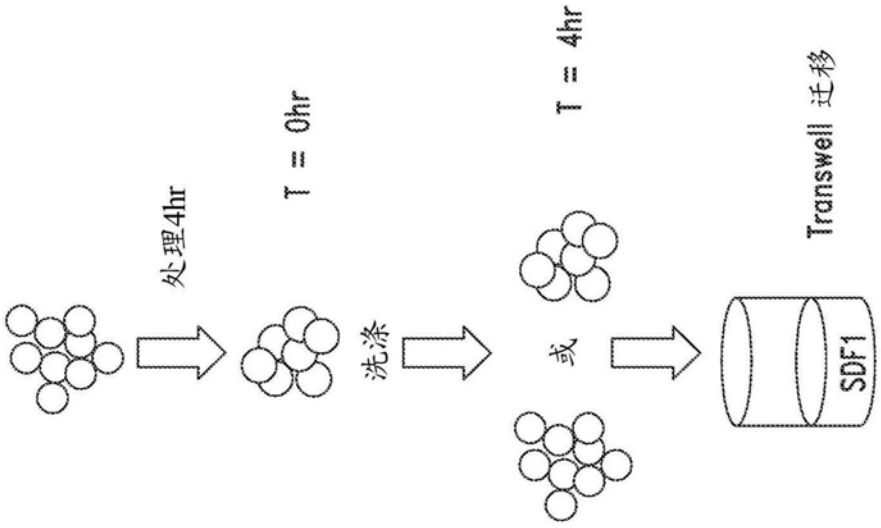

处理4hr
T = 0hr
洗涤
或
T = 4hr
Transwell 迁移
SDF1

图9

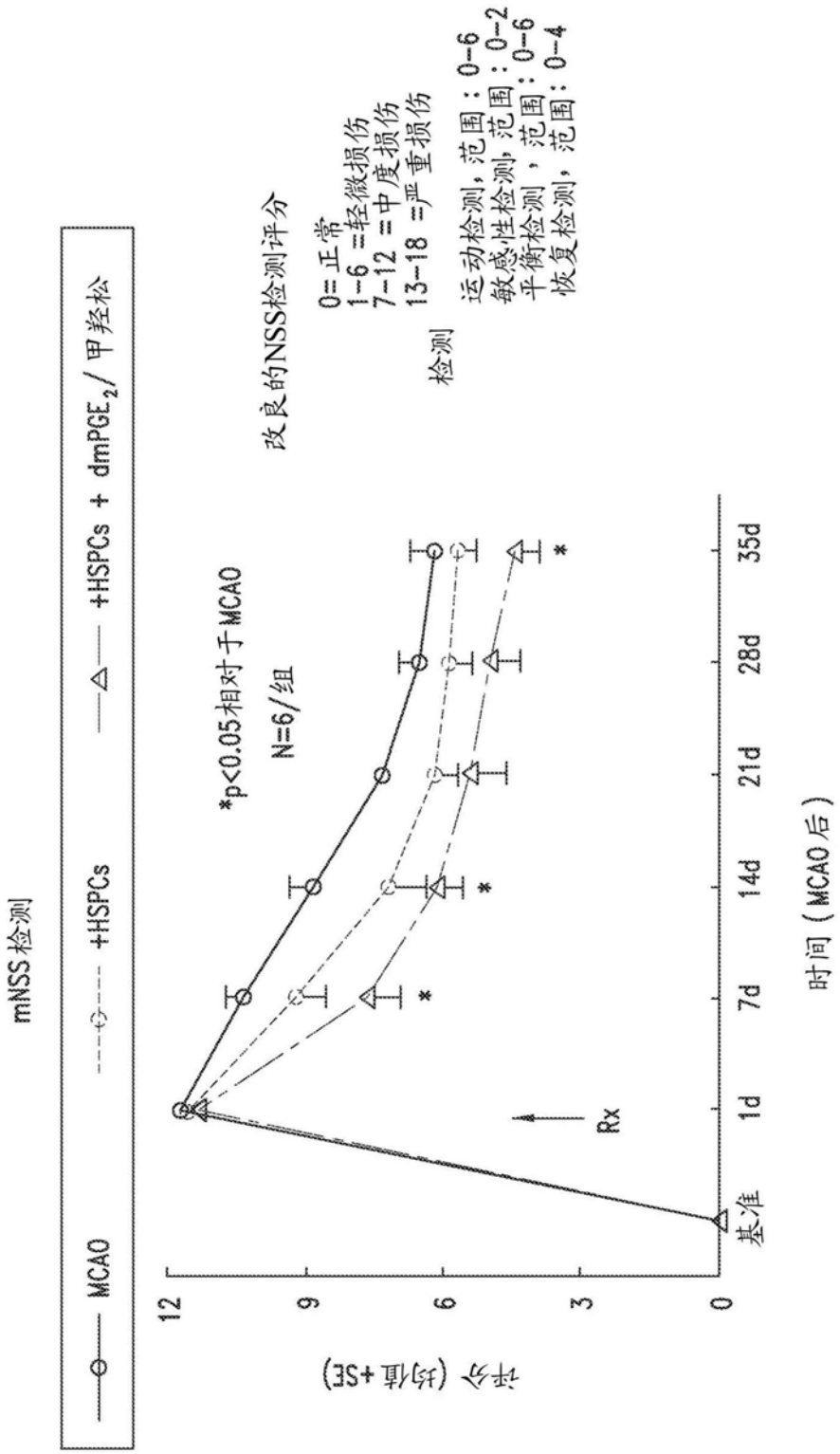

mNSS检测
MCAO
+HSPCs
+HSPCs + dmPGE2/甲羟松
改良的NSS检测评分
0=正常
1-6 =轻微损伤
7-12 =中度损伤
13-18 =严重损伤
检测
运动检测，范围：0-6
敏感性检测，范围：0-2
平衡检测，范围：0-6
恢复检测，范围：0-4
*p<0.05相对于MCAO
N=6/组
评分（均值+SE）
12
9
6
3
0
基准
1d
7d
14d
21d
28d
35d
Rx
时间（MCAO后）

图10

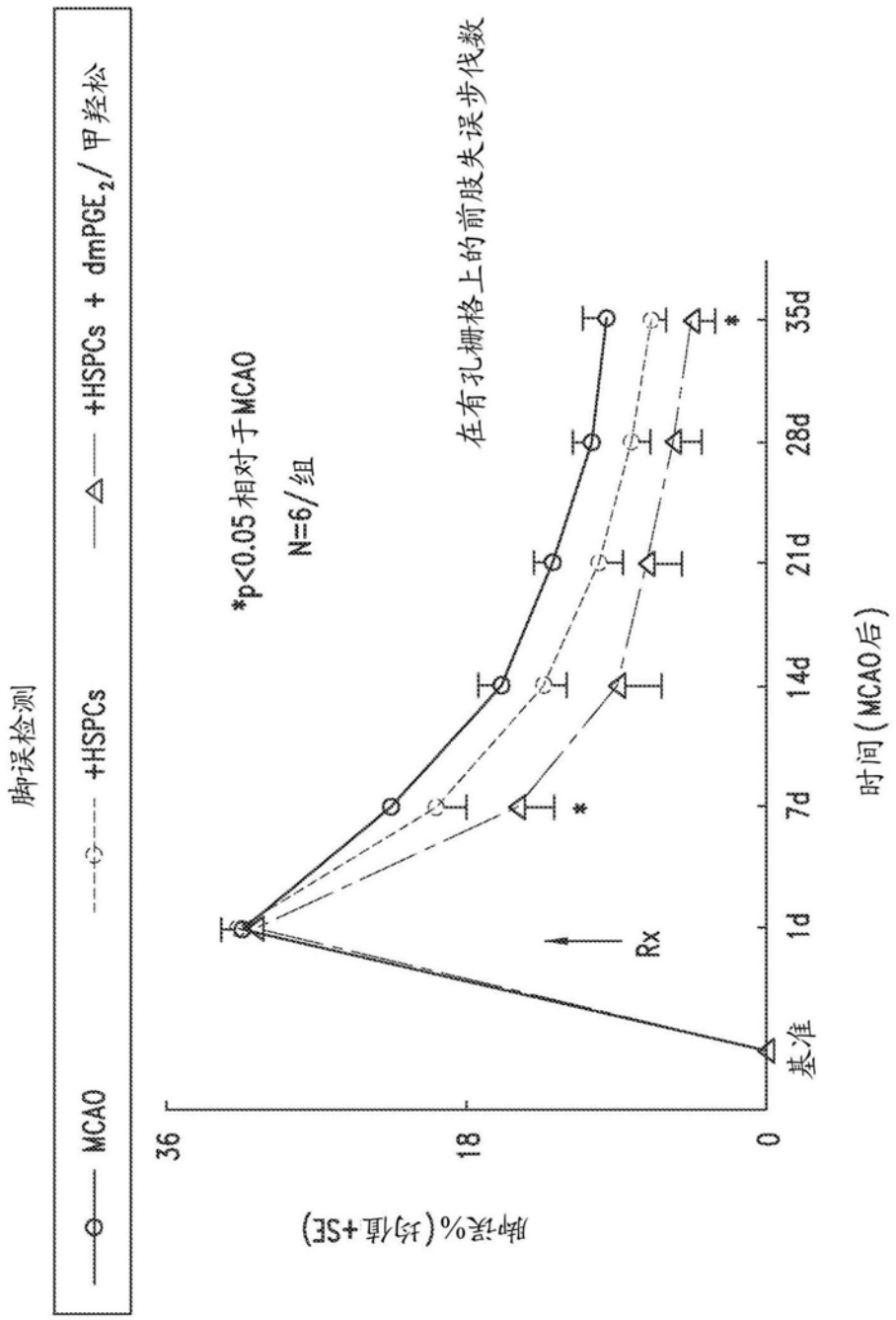

脚误检测
MCAO
+HSPCs
+HSPCs + dmPGE2/甲羟松
*p<0.05相对于MCAO
N=6/组
在有孔栅格上的前肢失误步伐数
脚误%(均值+SE)
36
18
0
Rx
*
*
基准
1d
7d
14d
21d
28d
35d
时间(MCAO后)

图11