



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112891374 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(21) 申请号 202110054916.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012.06.04

A61K 35/28 (2015.01)

(30) 优先权数据

A61P 9/10 (2006.01)

61/493,057 2011.06.03 US

C12N 5/0775 (2010.01)

(62) 分案原申请数据

201280033263.1 2012.06.04

(71) 申请人 麦瑟布莱斯特公司

地址 美国纽约州

申请人 中央阿德莱德当地卫生网络公司

(72) 发明人 西蒙·安德里亚·科博拉尔

斯坦·格劳恩索斯

艾格尼丝卡·亚瑟

(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

权利要求书1页 说明书40页

序列表10页 附图11页

(54) 发明名称

治疗中风的影响的方法

(57) 摘要

本发明提供了在患有中风的受试者中改善大脑功能或预防大脑功能丧失和/或治疗或预防运动障碍和/或使大脑神经元再生的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

1. 一种在患有中风的受试者中改善大脑功能或预防大脑功能丧失的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

2. 一种治疗或预防患有中风的受试者的运动障碍的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

3. 一种使患有中风的受试者的大脑神经元再生的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

4. 一种富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子,其用于改善中风后的受试者的大脑功能或治疗中风后的受试者的运动障碍或使中风后的受试者的大脑神经元再生。

5. 富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子的用途,其用于制造用于改善中风后的受试者的大脑功能或治疗中风后的受试者的运动障碍或使中风后的受试者的大脑神经元再生的药物。

## 治疗中风的影响的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是中国专利申请201280033263.1号的分案申请。本申请 要求于2012年6月3日提交的名称为“治疗中风的影响的方法”的美 国专利申请号61/493,057的优先权。所述申请的全部内容通过引用并 入本文。

[0003] 序列表

[0004] 序列表是与本申请一起以电子形式提交。所述序列表的全部内容 通过引用并入本文。

[0005] 领域

[0006] 本发明涉及治疗受试者的中风的影响的方法。

[0007] 背景

[0008] 在澳大利亚,中风是继心脏病之后的第二大死亡原因和残疾的主 要原因。在美国,它是死亡的第三大主要原因,每年有超过140,000 的人死于中风。在美国,它还是严重的长期残疾的主要原因。在美国, 从2005年至2050年期间,中风的计划花费为2.2万亿美元。

[0009] 残疾影响了75%的中风后存活者,而足以降低他们的就业能力。中风可以在身体上、精神上、情绪上或以这三种的组合形式来影响受 试者。

[0010] 中风所可能导致的一些肢体残疾包括肌无力、麻木、褥疮、肺炎、尿失禁、失用(不能进行学习到的运动)、开展日常活动困难、食欲丧 失、失语、视力丧失以及疼痛。如果中风足够严重,或在某个部位如 脑干部分,那么可能导致昏迷或死亡。

[0011] 由中风引起的情绪问题可能是由对脑部的情绪中枢的直接损伤 或由适应新的限制的挫折或困难所造成。中风后的情感障碍包括抑 郁、焦虑、恐慌发作、情感贫乏(不能表达情感)、躁狂症、情感淡漠 以及精神病。

[0012] 由中风引起的认知缺陷包括感知障碍、语言障碍、痴呆以及注意 力和记忆力的问题。中风患者可能不知道他或她自己的残疾,一种名 为疾病感缺失的病状。在一种名为偏侧空间忽视症的病状中,病人无 法参与与受损半球空间相反的一侧上的任何事。

[0013] 所有中风患者中高达10%发展成癫痫发作,最常见的是在事件后 的星期内。中风的严重性增加了癫痫的可能性。

[0014] 中风是由于脑供血的干扰而引起的快速发展的脑功能的丧失。这 可能是由于堵塞(血栓形成、动脉栓塞)或出血(血液渗漏)引起的缺血(血流量不足)。因此,脑部受影响的区域不能起作用,这可能导致受 试者不能移动躯体一侧的一个或多个肢体,不能理解或表述语言,或 不能看见视野的一侧。中风经常造成神经元细胞死亡或可能导致死 亡。

[0015] 有两种常见类型的中风:(i)缺血性中风,这是由供给脑部的血流 的暂时或永久性闭塞引起的,并且占中风病例的85%,以及(ii)出血 性中风,这是由破裂的血管引起的,并且占大多数其余病例。缺血性 中风最常见的原因是大脑中动脉(颈内动脉下游的颅内动脉)的闭塞, 这损害了大脑(例如,大脑皮层),例如脑部的运动和感觉皮层。所述 损害导致偏瘫、偏侧感觉缺失以及取决于所损害的大脑半球的语言或 者视觉空间缺陷。

[0016] 目前对缺血性中风的治疗已集中于对缺血半暗带的救治,即,保持结构完整性但是失去电功能的脑部的适度低灌注区。目前,只有四种临床上证明的治疗来改善中风后的预后:

[0017] • 阿司匹林,以预防进一步中风,

[0018] • 用组织型纤溶酶原激活剂的急性血栓溶栓,以逆转闭塞,

[0019] • 中风单元的管理,以及

[0020] • 偏侧颅骨切除术,以降低颅内压。

[0021] 然而,所述治疗仅试图减轻持续的神经损伤,并且不恢复丢失的神经元或脑功能。

[0022] 已测试了一些神经保护剂治疗中风的功效,并且已经失败,包括 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂、纳美芬、芦贝鲁唑、氯美噻唑、钙通道阻滞剂(包括 $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基异噻唑-4-丙酸拮抗剂、血清素受体激动剂(例如,瑞比诺坦)以及跨膜钾通道调节剂)、替拉扎特、抗 ICAM-1 抗体、人抗白细胞抗体(Hu23F2G)、抗血小板抗体(例如,阿昔单抗)、胞磷胆碱(胞苷-5'-二磷酸胆碱的外源性形式)以及碱性成纤维细胞生长因子。

[0023] 从上述内容可明显看出,在本领域中需要用于中风的治疗。一种所希望的治疗将修复由中风引起的至少一些神经损伤和/或恢复中风所致的至少一些脑功能丧失。

[0024] 概述

[0025] 本发明是基于发明人对对于治疗中风的影响有用的细胞群的鉴定。如本文所例示,发明人已示出了STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代和/或由其分泌的因子能够恢复中风后丧失的脑功能。示例性STRO-1<sup>+</sup>细胞是获自骨髓和/或牙髓并且可以在其用于疗法中之前培养和/或储存。发明人使用缺血性中风(例如,影响大脑)的一种已接受的动物模型来阐述细胞和/或分泌的因子治疗中风的影响的功效。

[0026] 例如,发明人示出了它们可以在中风后恢复大脑功能和/或治疗运动障碍。发明人还示出了STRO-1<sup>+</sup>细胞分泌因子(例如,SDF-1),其引起神经元的轴突的生长。不受任何理论或作用模式的束缚,发明人提出这些因素可能有助于神经保护、血管生成、免疫调节和/或神经可塑性。

[0027] 发明人还示出了STRO-1<sup>+</sup>细胞能够分化成神经元样细胞。然而,在注射至患有中风的受试者的脑部之后,这些细胞有很少存活超过数周。这些结果表明STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代和/或由其分泌的因子有助于中风后受试者自身的神经元的存活和/或再生。

[0028] 本文中呈现的这些研究结论提供了用于治疗中风的一种或多种影响的方法的基础。例如,所述方法包括对患有中风的受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0029] 本发明提供了在患有中风的受试者中改善大脑功能或预防大脑功能丧失的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0030] 在一个实施例中,改善受试者的大脑功能改善了受试者的运动障碍。在一个实施例中,大脑功能是大脑皮层功能,如运动皮层功能和/或感觉皮层功能。

[0031] 本发明额外或可选地提供了一种治疗或预防患有中风的受试者的运动障碍的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得

到的可溶性因子。

[0032] 在本文描述的方法的一个实施例中,运动障碍是麻痹、部分麻痹、言语不清、动作不协调、肌无力、张力减退、张力亢进或不自主的异常运动。

[0033] 本发明额外地提供了一种使患有中风的受试者的大脑神经元再生的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0034] 本发明额外地提供了一种治疗、减轻或预防患有中风的受试者的脑萎缩的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。在一个实施例中,所述萎缩是在胼胝体中。

[0035] 在一个实施例中,通过执行本发明的方法而再生的大脑神经元是在大脑皮层中,例如,在运动皮层和/或感觉皮层中。

[0036] 一个实施例中,所述中风是缺血性中风。

[0037] 本发明所涵盖的示例性中风是由受试者的大脑中动脉闭塞引起的缺血性中风。

[0038] 在一个实施例中,本发明的方法包括在中风后1小时与1个月之间,例如在1小时与2周之间,如在1小时与1周之间对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。例如,在中风后约72小时内施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。例如,在中风后约48小时内施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0039] 在另一个实施例中,所述方法包括在中风后24小时内对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。例如,在中风后约24小时时施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0040] 在一个实施例中,所述方法包括施用富含STRO-1<sup>亮</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。在一个实施例中,所述子代额外地富含STRO-1<sup>亮</sup>细胞。

[0041] 示例性细胞和/或子代额外地表达组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)和/或热休克蛋白90β(HSP90β)和/或CD146。

[0042] 在一个实施例中,细胞群来源于骨髓或牙髓。

[0043] 在一个实施例中,富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子是全身性地施用。

[0044] 在一个可选的实施例中,富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子是局部地施用于受试者的脑部。例如,富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子是局部地施用于受试者的大脑。在一个实施例中,所述群和/或子代和/或可溶性因子是额外地(或可选地)施用于受试者的纹状体。

[0045] 在一个实施例中,富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或其子代是施用于远离中风部位并且迁移至中风部位的部位,例如,施用于缺血性梗塞或围绕缺血性梗塞的边界区。

[0046] 本文中根据任何实施例描述的示例性方法包括施用足以改善大脑功能和/或使大脑神经元再生的剂量的所述群和/或所述子代和/或所述可溶性因子。

[0047] 在一个实施例中,所述方法包括施用有效剂量或治疗有效剂量的所述群和/或子代和/或可溶性因子。

[0048] 在一个实施例中,所述方法包括施用每公斤 $0.1 \times 10^6$ 至 $5 \times 10^6$ 之间个STRO-1<sup>+</sup>细

胞和/或其子代。例如,所述方法包括施用每公斤  $0.3 \times 10^6$  至  $2 \times 10^6$  之间个 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代。例如,所述方法包括施用每公斤  $0.5 \times 10^6$  至  $2 \times 10^6$  之间个 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代。例如,所述方法包括施用每公斤  $0.5 \times 10^6$  至  $1.5 \times 10^6$  之间个 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代。例如,所述方法包括施用每公斤约  $5 \times 10^5$  个 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代或每公斤约  $1.5 \times 10^6$  个 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代。例如,所述方法包括施用每公斤约  $1.8 \times 10^6$  个 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代。

[0049] 在一个实施例中,本文中根据任何实施例描述的方法包括施用低剂量的 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代。例如,低剂量的 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代包括每公斤  $0.1 \times 10^5$  与  $0.5 \times 10^6$  之间个 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代。

[0050] 在一个实施例中,所述群和/或所述子代和/或所述可溶性因子施用多次。例如,所述群和/或所述子代和/或所述可溶性因子是每四周或更多周施用一次。

[0051] 在一个实施例中,在施用后 28 天少于 25% 的 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代保留在受试者的脑(例如,大脑)中。例如,在施用后 28 天少于 10% 的 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代保留在受试者的脑(例如,大脑)中。例如,在施用后 28 天少于 5% 或 3% 的 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代保留在受试者的脑(例如,大脑)中。

[0052] 在一个实施例中,富含 STRO-1<sup>+</sup> 细胞的群和/或子代细胞是自体的或异体的和/或可溶性因子可以从自体或异体细胞得到。在一个实施例中,本文中根据任何实施例描述的方法包括分离或富集所述群和/或子代和/或分离所述可溶性因子。

[0053] 在本文中根据任何实施例描述的方法的实施例中,富含 STRO-1<sup>+</sup> 细胞的群和/或子代细胞已在施用之前和/或在获得所述可溶性因子之前经过培养扩增。在一个实施例中,本文描述的方法额外地包括培养所述群和/或子代。在一个实施例中,所述方法额外地包括储存所述群和/或子代。

[0054] 在一个实施例中,所述群和/或其子代细胞和/或由其得到的可溶性因子以包含所述 STRO-1<sup>+</sup> 细胞和/或其子代细胞和/或由其得到的可溶性因子和载体和/或赋形剂的组合物的形式来施用。在一个实施例中,本文中根据任何实施例描述的方法额外地包括将所述群和/或子代和/或可溶性因子与载体和/或赋形剂一起配制。

[0055] 在一个实施例中,本文中根据任何实施例描述的方法额外地包括测试治疗后受试者的大脑功能。例如,所述方法额外地包括测试受试者的运动和/或力量和/或语言和/或力量。在一个实施例中,如果受试者的大脑功能与施用所述群和/或子代和/或可溶性因子之前相比没有显著提高,那么所述方法包括施用另一个剂量的所述群和/或子代和/或可溶性因子。

[0056] 在一个实施例中,被治疗的受试者是哺乳动物,如灵长类,例如人。

[0057] 本发明还提供了富含 STRO-1<sup>+</sup> 细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子,其用于改善中风后的受试者的大脑功能或治疗中风后的受试者的运动障碍或使中风后的受试者的大脑神经元再生。

[0058] 本发明额外地提供了富含 STRO-1<sup>+</sup> 细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子的用途,其用于制造用于改善中风后的受试者的大脑功能或治疗中风后的受试者的运动障碍或使中风后的受试者的大脑神经元再生的药物。

[0059] 本发明还提供了一种包含富含 STRO-1<sup>+</sup> 细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得

到的可溶性因子的试剂盒,其与本文中根据任何实施例描述的方法的使用说明书一同包装。

[0060] 例如,本发明提供了一种包含含有所述群和/或子代和/或可溶性因子的组合物的试剂盒,其与指示在本文中根据任何实施例描述的方法中使用组合物的产品信息一同包装。

[0061] 本发明还提供了一种用于分离或培养STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代的试剂盒,其与本文中根据任何实施例描述的方法的使用说明书一同包装。

[0062] 本发明还提供了一种方法,包括用在本文中根据任何实施例描述的方法的使用说明书提供富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0063] 本发明还提供了一种方法,包括分离或提供来分离或储存或提供来储存富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子用于稍后在本文中根据任何实施例描述的方法中使用。

[0064] 本文描述的方法应在作了必要修改的情况下适用于降低进一步中风的风险的方法。

[0065] 作为非限制性实例,本申请提供了以下实施方案:

[0066] 1.一种在患有中风的受试者中改善大脑功能或预防大脑功能丧失的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0067] 2.如实施方案1所述的方法,其中改善所述受试者的大脑功能改善了所述受试者的运动障碍。

[0068] 3.一种治疗或预防患有中风的受试者的运动障碍的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0069] 4.如实施方案2或3所述的方法,其中所述运动障碍是麻痹、部分麻痹、言语不清、动作不协调、肌无力、张力减退、张力亢进或不自主的异常运动。

[0070] 5.一种使患有中风的受试者的大脑神经元再生的方法,所述方法包括对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0071] 6.如实施方案5所述的方法,其中所述大脑神经元是在大脑皮层中。

[0072] 7.如实施方案6所述的方法,其中所述大脑神经元是在运动皮层和/或感觉皮层中。

[0073] 8.如实施方案1至7中任一项所述的方法,其中所述中风是缺血性中风。

[0074] 9.如实施方案8所述的方法,其中所述缺血性中风是由受试者的大脑中动脉闭塞造成的。

[0075] 10.如实施方案1至9中任一项所述的方法,其包括在中风后1小时与2周之间对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0076] 11.如实施方案10所述的方法,其包括在中风后24小时内对所述受试者施用富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0077] 12.如实施方案1至11中任一项所述的方法,其包括施用富含STRO-1<sup>亮</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子。

[0078] 13.如实施方案12所述的方法,其中所述细胞额外地表达组织非特异性碱性磷酸

酶 (TNAP) 和/或热休克蛋白90 $\beta$  (HSP90P) 和/或 CD146。

[0079] 14. 如实施方案1至13中任一项所述的方法,其中所述细胞群 是获自骨髓或牙髓。

[0080] 15. 如实施方案1至8中任一项所述的方法,其中所述富含 STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子是全身性 地施用。

[0081] 16. 如实施方案1至14中任一项所述的方法,其中所述富含 STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子是对所述 受试者的脑部局部地施用。

[0082] 17. 如实施方案16所述的方法,其中所述富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的 群和/或其子代和/或由其得到的可溶性因子是对受试者的大脑局部地 施用。

[0083] 18. 如实施方案1至17中任一项所述的方法,其包括施用足以 改善大脑功能和/或使大脑神经元再生的剂量的所述群和/或所述子代 和/或所述可溶性因子。

[0084] 19. 如实施方案1至17中任一项所述的方法,其中所述群和/或 所述子代和/或所述可溶性因子施用多次。

[0085] 20. 如实施方案19所述的方法,其中所述群和/或所述子代和/ 或所述可溶性因子是每四周或更多周施用一次。

[0086] 21. 如实施方案1至20中任一项所述的方法,其包括施用每公 斤 $0.1 \times 10^6$ 至 $5 \times 10^6$ 之间个STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代。

[0087] 22. 如实施方案1至20中任一项所述的方法,其包括施用每公 斤 $0.3 \times 10^6$ 至 $2 \times 10^6$ 之间个STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代。

[0088] 23. 如实施方案1至20中任一项所述的方法,其包括施用低剂 量的STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代。

[0089] 24. 如实施方案23所述的方法,其中所述低剂量的STRO-1<sup>+</sup>细 胞和/或其子代包含每公斤 $0.1 \times 10^5$ 至 $0.5 \times 10^6$ 之间个STRO-1<sup>+</sup>细胞 和/或其子代。

[0090] 25. 如实施方案1至24中任一项所述的方法,其中所述富含 STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或子代细胞是自体的或异体的和/或所述可溶性 因子可以获自自体或异体细胞。

[0091] 26. 如实施方案1至25中任一项所述的方法,其中所述富含 STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或子代细胞已在施用之前和/或在获得所述可溶 性因子之前经过培养扩增。

[0092] 27. 如实施方案1至26中任一项所述的方法,其中所述STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细 胞和/或由其得到的可溶性因子以包含所述 STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细胞和/或由其得到 的可溶性因子和载体和/ 或赋形剂的组合物的形式来施用。

[0093] 28. 一种富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到 的可溶性因子, 其用于改善中风后的受试者的大脑功能或治疗中风后 的受试者的运动障碍或使中风后的 受试者的大脑神经元再生。

[0094] 23. 富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群和/或其子代和/或由其得到的可 溶性因子的用 途,其用于制造用于改善中风后的受试者的大脑功能或 治疗中风后的受试者的运动障碍 或使中风后的受试者的大脑神经元 再生的药物。

[0095] 附图简述

[0096] 图1. TNAP (STRO-3) 和间充质前体细胞标志物STRO-1<sup>亮</sup>在成人 骨髓单核细胞 (BMMNC) 中的共表达。通过孵育MACS选择的 BMMNC并用与FITC偶合的山羊抗鼠类IgM抗体间接标记的 STRO-1 (x轴) 和用与PE偶合的山羊抗鼠类IgG间接标记的STRO-3 mAb (鼠类IgG1)



(y轴)进行双色免疫荧光和流式细胞术。点阵直方图表示以列表模式数据形式收集的 $5 \times 10^4$ 个事件。垂直线和水平线设定为小于用在相同条件下处理的同种型匹配对照抗体1B5 (IgG)和1A6.12 (IgM)获得的平均荧光的1.0%的反应性水平。结果表明STRO-1<sup>亮</sup>细胞的较小群体共表达TNAP(右上象限),而其余STRO-1<sup>+</sup>细胞未能与STRO-3mAb反应。

[0097] 图2.培养和扩增的STRO-1<sup>亮</sup>MPC的STRO-1<sup>亮</sup>或STRO-1<sup>暗</sup>子代的基因表达谱。通过胰蛋白酶/EDTA处理制备离体扩增的骨髓MPC的单细胞悬浮液。将细胞用STRO-1抗体染色,所述STRO-1抗体随后通过与山羊抗鼠类IgM-异硫氰酸荧光素一起孵育加以显现。荧光活化细胞分选(A)后,由经过纯化的STRO-1<sup>暗</sup>或STRO-1<sup>亮</sup>表达细胞的群制备总细胞RNA。使用RNAzolB提取方法和标准程序,从各子群分离总RNA并且用作cDNA合成的模板。使用如先前所描述的标准方案(Gronthos等J Cell Sci. 77 (5):1827-1835, 2003)通过PCR扩增评定各种转录物的表达。此研究中所用的引物组在表2中示出。扩增后,通过1.5%琼脂糖凝胶电泳对各反应混合物进行分析,并且通过溴化乙锭染色进行观测(B)。使用ImageQuant软件参考持家基因GAPDH的表达来评定各细胞标志物的相对基因表达(C)。

[0098] 图3.培养和扩增的STRO-1<sup>+</sup>MPC的STRO-1<sup>亮</sup>子代表达高水平的SDF-1,STRO-1<sup>暗</sup>子代则不能。(A)使用FACS根据区域STRO-1<sup>亮</sup>和STRO-1<sup>暗/深</sup>将通过MACS分离的STRO-1<sup>+</sup>BMMNC制备物划分为不同的STRO-1子集。从各STRO-1子群制备总RNA并且用于构建STRO-1<sup>亮</sup>消减杂交文库(B-C)。复制已经用由经过STRO-1<sup>亮</sup>消减cDNA转化的细菌克隆扩增的代表性PCR产物点印的硝化纤维素过滤器。所述过滤器接着用 $[^{32}\text{P}]$ 三磷酸脱氧胞苷(dCTP)标记的STRO-1<sup>亮</sup>(B)抑或STRO-1<sup>暗/深</sup>(C)消减cDNA探测。箭头指示含有对应于人SDF-1的cDNA片段的1个克隆的差异表达。(D)逆转录酶(RT)-PCR分析显示由在培养前通过MACS/FACS新鲜分离的BMMNC STRO-1群体制备的总RNA中SDF-1和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)转录物的相对表达。bp表示碱基对。

[0099] 图4.人DPSC分化成神经元样细胞。(A)显微照片的复本示出了人包皮成纤维细胞(HFF)在体外对神经元诱导培养基无反应。(B)显微照片的复本示出了hDPSC在体外在神经元诱导培养基中分化成神经元表型。(C)图形表示示出了响应于持续30ms、跨度范围为-44mV至36mV、步幅10mV,在分化的DPSC中记录的 $\text{Na}^+$ 电流迹线的代表性实例。(D)图形表示示出了响应于电压跨度(voltage step)在分化的(D)和未分化的(N.D.)DPSC中获得的 $\text{Na}^+$ 电流峰值的平均I-V绘图。

[0100] 图5.一系列表示描绘了用于治疗中风模型的过程。图A示出使用2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色的代表性大鼠脑部冠状切片来使大脑中动脉闭塞(MCAo)后1天的梗塞(白色)组织可视化。图B示出了使用抗人线粒体抗原抗体和苏木精染色的代表性大鼠脑部冠状切片。图A和B中的黑点表示位于相对于前脑的前侧-后侧-0.40mm、内侧-外侧-4.00mm,距离硬脑膜背侧-腹侧-5.50mm的第一纹状体注射部位,和位于距离硬脑膜背侧-腹侧-1.75mm的第二皮层注射部位。图C示出了治疗方案的图解表示,其中动物在MCAo前训练3天(表示为第0天),并且第三段用作术前基线(第-1天)。在MCAo后24小时将动物随机分配以接受人DPSC或单独的培养基。在MCAo后第1天、第7天、第14天、第21天、第28天由不知道治疗分组的研究者来执行行为评估。在实验期间,所有动物都接受每天皮下注射10mg/kg的环孢菌素A。将动物处死,并且在神经行为学研究结束时对它们的脑部进行免疫组织化学处理。比例尺=2mm(A,B)。缩写:Cx,大脑皮层;DPSC,骨髓干细胞;MCAo,大脑中动脉闭塞;

Str,纹状体。

[0101] 图6.一系列图形表示示出了人DPSC治疗对MCAo后神经行为 结果的效果。在MCAo之后,所有动物在所有的行为测试(第1天或 第7天对第-1天)中都表现出功能缺陷。图A示出了在移植后4周时,与媒介物治疗的动物相比DPSC治疗的动物显示了总神经评分的明显改善( $p < 0.018$ 组 $\times$ 天相互作用,重复测量的方差分析[ANOVA];在 第21天和第28天在治疗组之间分别为 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ ;事后费 雪保护的最小显著差异)。如图B中示出的,如通过在步进测试中用 侧前肢进行的明显更大数量的步进所证明的,DPSC-移植组还示出了明显改善的前肢感觉运动能力( $p = 0.045$ 总治疗效果)。图C还示出,与媒介物治疗组相比,DPSC移植组还显示了在胶带去除测试中试图 从对侧前爪去除标签的明显更小的时间比例( $p = 0.049$ 总治疗效果)。治疗组之间的行为表现的差异在转棒(图D)和锥形/壁架平衡木行走(图E)测试中不能达到统计显著性( $p > 0.05$ ,重复测量的ANOVA)。由于盘旋行为,中风动物在MCAo后1天时不能完成平衡木行走任 务。已将数据标绘为箱线图来使值的分布可视化。箱中的中央星号表 示中值,并且箱表示值的中间50%(即,它的范围为第25百分位至第 75百分位)。触线(whisker)示出了数据的范围,极端观测值由外围圆 圈呈现。缩写:DPSC,牙髓干细胞;MCAo,大脑中动脉闭塞。

[0102] 图7.摄影表示的复本示出了在缺血后的脑中存活的DPSC的分 布。代表性大鼠脑部冠状切片示出了移植后4周时移植的DPSC(单个 细胞指示为黑点)的存活和迁移模式。针对人线粒体抗原染色切片以 检测来自大鼠脑组织中的人细胞。注意到,DPSC的靶标迁移朝 向中 风损伤并且最终围绕闭塞积累。比例尺=2mm。缩写:B,前窗;CC, 胼胝体;Cx,大脑皮层;DG,背侧海马齿状回;LV,侧脑室;Str, 纹状体。

[0103] 图8.摄影表示的复本示出了在中风后28天时植入的人DPSC的 形态。在大脑中动脉闭塞后4周的啮齿动物脑中的人DPSC的高倍放 大图(人线粒体抗原阳性细胞染深灰色,图的右手边)描绘了在紧邻梗 塞核心内的积累(图A)和明显的沿CC的迁移(图B)。注意到,DPSC 在注射和中风部位对侧的大脑半球内的稀疏分布。圆点指示单个的人 DPSC。图C示出了一些获自DPSC的细胞似乎植入大脑血管壁内,形态外观与内皮细胞(箭状物)、周皮细胞或平滑肌细胞(箭头)一致。图D示出了获自DPSC的细胞的形态提示星形胶质细胞(箭状物)和神 经元(箭头)。比例尺=2mm(图A、图B)和25 $\mu\text{m}$ (图C、图D以及图 A、图B中的=40倍放大插图)。缩写:B,前窗;CC,胼胝体。

[0104] 图9.一系列表示示出了DPSC治疗对健侧CC萎缩的效果。图 A示出了在前窗水平处的代表性大鼠脑切片,其中指示了在同侧和对 侧两个半球中用于测量在脑中线处(L1)和在侧脑室侧缘处(L2)的CC 厚度的两个部位。图B示出了在移植后4周时,与媒介物治疗的动物相比,DPSC治疗的动物的健侧半球中有胼胝体萎缩减少的趋势。L2(同侧)针对L1(中线)CC测量的正常化不能达到统计显著性( $P > 0.05$ )。在治疗组之间的对侧CC厚度测量值不存在差异。数据显示为 平均值 $\pm$ SEM。比例尺=100 $\mu\text{m}$ 。缩写:CC,胼胝体;Contra,对侧;Cx,大 脑皮层;DPSC,牙髓干细胞;Ipsi,同侧;LV,侧脑室。

[0105] 图10.图形表示示出了使用利用山羊抗鼠类IgM或IgG缀合的 FITC二次抗体检测时相对于同种型(IgM、IgG2a以及IgG1)阴性对照(虚线)具有间充质干细胞标志物STRO-1、STRO-4以及CD146(实线)阳性细胞表面表达的培养扩增骨髓来源的食蟹 猕猴MPC的单细胞悬 浮液所产生的代表性流式细胞术直方图。代表性直方图还示出了食蟹 猕猴MPC缺乏单

核细胞/巨噬细胞 (CD14)、造血干/祖细胞 (CD34) 以及成熟白细胞 (CD45) 的细胞表面标志物表达。与同种型对照相比大于 1% 的荧光水平表示为阳性。

[0106] 序列表注释

- [0107] SEQ ID NO:1--用于扩增编码GAPDH的核酸的寡核苷酸。
- [0108] SEQ ID NO:2--用于扩增编码GAPDH的核酸的寡核苷酸
- [0109] SEQ ID NO:3--用于扩增编码SDF-1的核酸的寡核苷酸
- [0110] SEQ ID NO:4--用于扩增编码SDF-1的核酸的寡核苷酸
- [0111] SEQ ID NO:5--用于扩增编码IL-1 $\beta$ 的核酸的寡核苷酸
- [0112] SEQ ID NO:6--用于扩增编码IL-1 $\beta$ 的核酸的寡核苷酸
- [0113] SEQ ID NO:7--用于扩增编码FLT-1的核酸的寡核苷酸
- [0114] SEQ ID NO:8--用于扩增编码FLT-1的核酸的寡核苷酸
- [0115] SEQ ID NO:9--用于扩增编码TNF-a的核酸的寡核苷酸
- [0116] SEQ ID NO:10--用于扩增编码TNF-a的核酸的寡核苷酸
- [0117] SEQ ID NO:11--用于扩增编码KDR的核酸的寡核苷酸
- [0118] SEQ ID NO:12--用于扩增编码KDR的核酸的寡核苷酸
- [0119] SEQ ID NO:13--用于扩增编码RANKL的核酸的寡核苷酸
- [0120] SEQ ID NO:14--用于扩增编码RANKL的核酸的寡核苷酸
- [0121] SEQ ID NO:15--用于扩增编码瘦蛋白的核酸的寡核苷酸
- [0122] SEQ ID NO:16--用于扩增编码瘦蛋白的核酸的寡核苷酸
- [0123] SEQ ID NO:17--用于扩增编码CBFA-1的核酸的寡核苷酸
- [0124] SEQ ID NO:18--用于扩增编码CBFA-1的核酸的寡核苷酸
- [0125] SEQ ID NO:19--用于扩增编码PPAR  $\gamma$  2的核酸的寡核苷酸
- [0126] SEQ ID NO:20--用于扩增编码PPAR  $\gamma$  2的核酸的寡核苷酸
- [0127] SEQ ID NO:21--用于扩增编码OCN的核酸的寡核苷酸
- [0128] SEQ ID NO:22--用于扩增编码OCN的核酸的寡核苷酸
- [0129] SEQ ID NO:23--用于扩增编码MyoD的核酸的寡核苷酸
- [0130] SEQ ID NO:24--用于扩增编码MyoD的核酸的寡核苷酸
- [0131] SEQ ID NO:25--用于扩增编码SMMHC的核酸的寡核苷酸
- [0132] SEQ ID NO:26--用于扩增编码SMMHC的核酸的寡核苷酸
- [0133] SEQ ID NO:27--用于扩增编码GFAP的核酸的寡核苷酸
- [0134] SEQ ID NO:28--用于扩增编码GFAP的核酸的寡核苷酸
- [0135] SEQ ID NO:29--用于扩增编码巢蛋白的核酸的寡核苷酸
- [0136] SEQ ID NO:30--用于扩增编码巢蛋白的核酸的寡核苷酸
- [0137] SEQ ID NO:31--用于扩增编码SOX9的核酸的寡核苷酸
- [0138] SEQ ID NO:32--用于扩增编码SOX9的核酸的寡核苷酸
- [0139] SEQ ID NO:33--用于扩增编码X型胶原的核酸的寡核苷酸
- [0140] SEQ ID NO:34--用于扩增编码X型胶原的核酸的寡核苷酸
- [0141] SEQ ID NO:35--用于扩增编码聚集蛋白聚糖的核酸的寡核苷酸
- [0142] SEQ ID NO:36--用于扩增编码聚集蛋白聚糖的核酸的寡核苷酸

[0143] 详细描述

[0144] 通用技术和选定的定义

[0145] 在本说明书中,除非另有特别说明或上下文另有要求,否则提及 单个步骤、物质的组合物、步骤的组或物质组合物的组应视为包括那 些步骤、物质组合物、步骤的组或物质组合物的组中的一个或多个 (即,一个或多个)。

[0146] 除非特别声明,否则本发明的每个实施例在作必要的修改的情况 下适用于各个和每个其它实施例。

[0147] 本领域的技术人员应了解,本发明容许具体描述的内容以外的变 化和修改。应理解,本发明包括所有这些变化和修改。本发明还包括 在本说明书中个别地或共同地提及或指示的所有的步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征的任何和所有组合或其任何两者或 更多者。

[0148] 本发明的范围不受本文描述的具体实施例限制,所述实施例意图 只是用于示例的目的。功能上等价的产物、组合物和方法清楚地在本 发明的范围内。

[0149] 除非另有指示,否则在不进行过度实验的情况下使用分子生物 学、微生物学、病毒学、重组DNA技术、溶液相肽合成、固相肽合 成以及免疫学的常规技术来执行本发明。所述程序描述于以下文献 中,例如Sambrook,Fritsch和Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories,New York,第 二版(1989),卷I、II以及III全部;DNA Cloning:A Practical Approach, 卷I和II(D.N.Glover编著,1985), IRL Press,Oxford,全文; Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach (M.J.Gait编著,1984) IRL Press,Oxford,全文,以及尤其是其中Gait的论文,第1-22页; Atkinson等,第35-81页;Sproat等,第83-115页;以及Wu等,第 135-151页;4.Nucleic Acid Hybridization:A Practical Approach(B.D. Hames和S.J.Higgins编著,1985) IRL Press,Oxford,全文; Immobilized Cells and Enzymes:A Practical Approach(1986) IRLPress, Oxford,全文;Perbal,B.,A Practical Guide to Molecular Cloning (1984);Methods In Enzymology(S.Colowick和N.Kaplan编著, Academic Press,Inc.), 全系列;J.F.Ramalho Ortigao,"The Chemistry of Peptide Synthesis"见:Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website(Interactiva,Germany); Sakakibara,D.,Teichman,J., Lien,E.Land Fenichel,R.L.(1976) .Biochem.Biophys.Res.Commun. 73 336-342;Merrifield,R.B.(1963) .J.Am.Chem.Soc.85,2149-2154; Barany,G.和Merrifield,R.B.(1979) 见The Peptides (Gross,E.和 Meienhofer,J.编著),卷.2,第1-284页,Academic Press,New York 12. Wü nsch,E.编著(1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie(Müler,E.编著),卷15,第4版,第1 和2部分,Thieme,Stuttgart; Bodanszky,M.(1984)Principles of Peptide Synthesis,Springer-Verlag,Heidelberg; Bodanszky,M.和Bodanszky,A. (1984)The Practice of Peptide Synthesis,Springer-Verlag,Heidelberg; Bodanszky,M.(1985)Int.J.Peptide Protein Res.25,449-474; Handbook of Experimental Immunology,卷I-IV(D.M.Weir和C.C.Blackwell 编著,1986, Blackwell Scientific Publications);以及Animal Cell Culture: Practical Approach,第3版(John R.W.Masters编著,2000),ISBN 0199637970,全文。

[0150] 在本说明书中,除非全文另有要求,否则词语“包括(comprise)”,或变化形式如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”,将被理解为意指包括所述步骤或要素或整数或者步骤或要素或整体的组,但是不排除任何其它的步骤或要素或整数或者要素或整数的组。

[0151] 如本文中所述的,术语“来源于”应意味指示指定的整数可从特定的来源来获得,即使不一定直接来自该来源。在由STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细胞得到的可溶性因子的上下文中,这个术语应意味一种或多种因子,例如蛋白质、肽、碳水化合物等等是在体外培养STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细胞期间产生。

[0152] 本文中所述的术语“中风”应意味着脑功能的丧失,通常快速进展,这是由于对通向脑部或脑干的血流的干扰。这种干扰可以由例如血栓形成或栓塞引起的缺血(缺少血),或可以是由于出血。在一个实施例中,脑功能丧失伴随着神经元细胞死亡。在一个实施例中,中风是由来自(至)大脑或其一个区域的血液的干扰或损失所造成。在一个实施例中,中风是持续超过24小时或在24小时内因死亡而中断的脑血管原因的神经功能缺失(如世界卫生组织所定义)。症状持续超过24小时将中风与短暂性脑缺血发作(TIA)区分开,在TIA中症状持续少于24小时。中风的症状包括偏瘫(身体一侧麻痹);轻偏瘫(身体一侧虚弱);面部肌无力;麻木;感觉减退;嗅觉、味觉、听觉或视觉改变;嗅觉、味觉、听觉或视觉丧失;眼睑下垂(上睑下垂);可检测的眼部肌无力;咽反射减少;吞咽能力降低;瞳孔对光反应性下降;面部感觉减退;平衡下降;眼球震颤;呼吸频率改变;心率改变;胸锁乳突肌无力伴随头部偏向一侧的能力下降或无能;舌头无力;失语症(不能说话或理解语言);失用症(随意运动改变);视野缺损;记忆缺失;半侧忽视或半侧空间忽视(对损害对侧的视野空间的注意力的缺失);思维瓦解;混乱;性欲过度姿势的发展;疾病失认症(持续否认缺失的存在);行走困难;运动协调改变;眩晕;平衡失调;意识丧失;头痛;和/或呕吐。

[0153] 技术人员将知道“大脑”包括大脑皮层(或大脑半球皮层)、基底神经节(或基底核)以及边缘系统。

[0154] 术语“大脑功能”包括:

[0155] • 推理、计划,言语、动作、情绪以及解决问题的部分(与额叶相关);

[0156] • 刺激的移动、定位、识别、感知(与顶叶相关);

[0157] • 视觉处理(与枕叶相关);以及

[0158] • 感知和识别听觉刺激、记忆以及语言(与颞叶相关)。

[0159] 本文所用的术语“运动障碍”应意指与中风之前相比,受试者运动能力的任何改变。示例性运动障碍包括麻痹、部分麻痹、言语不清、动作不协调、肌无力、张力减退、张力亢进或不自主的异常运动。

[0160] 本文所用的使神经元“再生”应意指受试者的内源性神经元被诱导生长(例如,生长轴突)和/或分裂和/或内源性神经干细胞被诱导生长和/或分裂和/或分化来产生新的神经元。这与施用的分化产生神经元的细胞不同。这个术语不意指使神经元再生的方法不能额外地包括施用的细胞分化成神经元或其它细胞类型。

[0161] 本文所用的术语“有效量”应意指足以诱导患有中风的受试者的大脑神经元再生和/或分化成受试者的神经元的富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或其子代细胞和/或由其得到的可溶性因子的量。有效量不一定要足以提供其自身的治疗效益,例如,多次施用有效量的

群和/或细胞和/或可溶性因子可以提供治疗效益。

[0162] 本文所用的术语“治疗有效量”应意指足以在患有中风的受试者中改善大脑功能和/或治疗运动障碍和/或使大脑神经元再生的富含 STRO-1<sup>+</sup>细胞的群和/或其子代细胞和/或由其得到的可溶性因子的量。

[0163] 本文所用的术语“低剂量”应理解为意指STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代的量少于 $1 \times 10^6$ 个,但仍然足以是如本文定义的“有效量”和/或如本文定义的“治疗有效量”。例如,低剂量包括 $0.5 \times 10^6$ 个或更少的细胞,或 $0.4 \times 10^6$ 个或更少的细胞或 $0.3 \times 10^6$ 个或更少的细胞或 $0.1 \times 10^6$ 个或更少的细胞。

[0164] 本文所用的术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”应理解为意指施用一定量的可溶性因子和/或细胞并且降低运动障碍的严重性。

[0165] 本文所用的术语“预防(prevent)”或“预防(preventing)”或“预防(prevention)”应理解为意指施用一定量的可溶性因子和/或细胞并且停止或阻止或延迟中风后运动障碍的发展或进展和/或大脑功能的丧失。因此,本发明的方法应意味着在作了必要修改的情况下适用于预防患有中风的受试者的运动障碍或大脑功能丧失的方法。

[0166] 本文所用的术语“可溶性因子”应理解为指可溶于水的由 STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代产生的任何分子,例如蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、脂蛋白、脂肽、碳水化合物等。所述可溶性因子可以在细胞内和/或由细胞分泌。所述可溶性因子可以是复杂混合物(例如上清液)和/或其组分和/或可以是纯化的因子。在本发明的一个实施例中,可溶性因子是上清液或含于上清液内。因此,本文涉及施用一种或多种可溶性因子的任何实施例应理解为在作了必要的修改的情况下适用于施用上清液。

[0167] 本文所用的术语“上清液”指的是在合适的培养基(如,液体培养基)中体外培养 STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代后产生的非细胞物质。通常,上清液由在适宜的条件和时间下在培养基中培养细胞,随后通过如离心等过程去除细胞物质后所产生。在施用之前,上清液可能会或可能不会经受进一步的纯化步骤。在一个实施例中,上清液包含少于 $10^5$ 个,更多,例如,少于 $10^4$ 个,如少于 $10^3$ 个并且例如,无活细胞。

[0168] 本文所用的术语“正常或健康个体”应意指不患有中风的受试者。

[0169] 在本说明书中,术语“中风的影响”将被理解为包括并且为以下一项或多项提供文字支持:改善大脑功能、治疗或预防运动障碍和/或使大脑神经元再生。

[0170] STRO-r细胞或子代细胞,和由其得到的上清液或者一种或多种可溶性因子

[0171] STRO-1<sup>+</sup>细胞为在骨髓、血液、牙髓细胞、脂肪组织、皮肤、脾、胰、脑、肾、肝、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、淋巴结、胸腺、骨、韧带、肌腱、骨骼肌、真皮和骨膜中发现的;并且能够分化成生殖系如中胚层和/或内胚层和/或外胚层的细胞。STRO-1<sup>+</sup>细胞的示例性来源是获自骨髓和/或牙髓。

[0172] 在一个实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞是多能细胞,其能够分化成大量细胞类型,包括但不限于脂肪组织、骨组织、软骨组织、弹性组织、肌肉组织和纤维结缔组织。这些细胞所进入的特定谱系决定和分化路径取决于来自机械影响和/或内源性生物活性因子(如生长因子、细胞因子)和/或由宿主组织建立的局部微环境条件的各种影响。STRO-1<sup>+</sup>多能细胞因此为非造血祖细胞,其分裂产生子细胞,所述子细胞为干细胞或适时不可逆分化产生表型细胞的前体细胞。

[0173] 在一个实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞能够分化成神经元或神经元样细胞。

[0174] 在一个实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞分泌一种或多种诱导或促进神经元轴突生长的因子。

[0175] 在一个实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞是从由受试者(例如欲治疗的受试者或相关受试者或不相关受试者(无论是相同物种抑或不同物种))获得的样本富集而来。术语“富含”或其变形在本文中用于描述一种细胞群体,其中当与细胞的未处理群体(例如处于天然环境中的细胞)相比较时,一种特定细胞类型的比例或者多种特定细胞类型的比例增加。在一个实施例中,富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的群包含至少约0.1%或0.5%或1%或2%或5%或10%或15%或20%或25%或30%或50%或75%的STRO-1<sup>+</sup>细胞。在这方面,术语“富含STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群”将被理解为为术语“包含X%STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞群”提供明确的支持,其中X%是本文列举的百分比。在某些实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞可以形成无性系的集落,例如,CFU-F(成纤维细胞)或其亚群(例如50%或60%或70%或70%或90%或95%)可以具有这种活性。

[0176] 在一个实施例中,细胞群是富含包含处于可选择的形式STRO-1<sup>+</sup>细胞的细胞制剂。在这方面,术语“可选择的形式”将被理解为意指细胞表达允许选择STRO-1<sup>+</sup>细胞的标志物(例如,一种细胞表面标志物)。标志物可以是STRO-1,但不一定是。例如,如本文描述的和/或例证的,表达STRO-2和/或STRO-3(TNAP)和/或STRO-4和/或VCAM-1和/或CD146和/或3G5的细胞(例如MPC)也表达STRO-1(并且可以是STRO-1<sup>亮</sup>)。因此,表明细胞是STRO-1<sup>+</sup>并不意指细胞由STRO-1表达来选择。在一个实施例中,细胞是基于至少表达STRO-3来选择,例如,它们是STRO-3<sup>+</sup>(TNAP<sup>+</sup>)。

[0177] 提及选择细胞或其群不需要从特定的组织来源进行选择。如本文描述的,STRO-1<sup>+</sup>细胞可以从种类繁多的来源中进行选择或分离或富集的。也就是说,在某些实施例中,这些术语为从任何包含STRO-1<sup>+</sup>细胞(例如,MPC)的组织或血管化组织或包含周细胞(例如STRO-1<sup>+</sup>周细胞)的组织或本文描述的组织中的任何一种或多种中进行选择提供支持。

[0178] 在一个实施例中,细胞表达一种或多种个别地或全体选自以下组成的组的标志物:TNAP<sup>+</sup>、VCAM-1<sup>+</sup>、THY-1<sup>+</sup>、STRO-2<sup>+</sup>、STRO-4<sup>+</sup>(HSP-90β)、CD45<sup>+</sup>、CD146<sup>+</sup>、3G5<sup>+</sup>或其任何组合。

[0179] 在一个实施例中,细胞表达或细胞群富含表达STRO-1<sup>+</sup>(或STRO-1<sup>亮</sup>)和CD146<sup>+</sup>的间充质前体细胞。

[0180] “个别地”指本发明独立地涵盖所述标志物或标志物组,以及虽然个别标志物或标志物组可能未独立地在本文中列出,但随附权利要求书仍可彼此独立地和分开地定义所述标志物或标志物组。

[0181] “全体”指本发明涵盖任何数量的所述标志物或标志物组或其组合,以及虽然所述数量的标志物或标志物组或其组合可能未在本文中具体列出,但随附权利要求书仍可将所述组合或子组合与标志物或标志物组的任何其它组合独立地和分开地定义。

[0182] 在一个实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞是STRO-1<sup>亮</sup>(与STRO-1<sup>bri</sup>同义)。在一个实施例中,相对于STRO-1<sup>暗</sup>或STRO-1<sup>中间</sup>细胞,STRO-1<sup>bri</sup>细胞优先富集。

[0183] 例如,STRO-1<sup>亮</sup>细胞另外是TNAP<sup>+</sup>、VCAM-1<sup>+</sup>、THY-1<sup>+</sup>、STRO-2<sup>+</sup>、STRO-4<sup>+</sup>(HSP-90β)和/或CD146<sup>+</sup>中的一种或多种。例如,细胞是为一种或多种的前述标志物而选择和/或显示表

达一种或多种 前述标志物。在这方面,显示表达标志物的细胞不需要被特别地测试,而是可以测试预先富集或分离的细胞并且随后使用,可以合理地假设 分离的或富集的细胞也表达同样的标志物。

[0184] 在一个实施例中,间充质前体细胞是WO 2004/85630中所定义的血管周围间充质前体细胞。例如,间充质前体细胞表达血管周围细胞的标志物,例如,细胞是STRO-1<sup>+</sup>或STRO-1<sup>亮</sup>和/或3G5<sup>+</sup>。在一个 实施例中,细胞是或以前是或是从血管化组织或器官或其部分中分离 的子代细胞。

[0185] 对于指定标志物称为“阳性”的细胞,其可能根据标志物存在于细胞表面上的程度而表达低(1o或暗)或高(亮、亮)水平的所述标志物,其中所述术语涉及细胞分选过程中所用的荧光或其它标志物的强度。1o(或暗或深)和亮的区别应放在所分选特定细胞群体上所用的标志物 的情形中加以理解。对于指定标志物称为“阴性”的细胞不一定完全不 存在于所述细胞。所述术语指细胞表达所述标志物的水平相对极低,并且当在可检测标记时产生极低信号或者在背景水平以上不可检测, 例如使用同种型对照抗体检测到的水平。

[0186] 当在本文中使用时,术语“亮”是指细胞表面上的标志物在可检测 标记时产生相对较高的信号。虽然不希望受理论限制,但提出“亮”细胞所表达的靶标志物蛋白(例如由STRO-1识别的抗原)比样本中的 其它细胞多。例如,当用缀合FITC的STRO-1抗体标记时,如通过 荧光活化细胞分选(FACS)分析所测定的STRO-1<sup>亮</sup>细胞产生比非亮细胞((STRO-1<sup>深/暗</sup>)高的荧光信号。例如,“亮”细胞构成起始样本中所含 的最亮标记的骨髓单核细胞的至少约0.1%。在其它实施例中,“亮”细胞构成起始样本中所含的最亮标记的骨髓单核细胞的至少约 0.1%、至少约0.5%、至少约1%、至少约1.5%或至少约2%。在一个 实施例中,STRO-1<sup>亮</sup>细胞的STRO-1表面表达相对于“背景”(即 STRO-1<sup>-</sup>细胞)具有2个对数量级以上的表达。相比之下,STRO-1<sup>暗</sup>和/或STRO-1<sup>中间</sup>细胞的STRO-1表面表达与“背景”相比具有小于2个 对数量级的表达,通常与“背景”相比约1个对数以下。

[0187] 本文所用的术语“TNAP”意图涵盖组织非特异性碱性磷酸酶的所有亚型。例如,所述术语涵盖肝亚型(LAP)、骨亚型(BAP)和肾亚型(KAP)。在一个实施例中,TNAP是BAP。在一个实施例中,如本文 所用的TNAP是指可以结合由2005年12月19日根据布达佩斯条约(Budapest Treaty)的规定以保藏编号PTA-7282保藏于ATCC的杂交瘤 细胞系产生的STRO-3抗体的分子。

[0188] 此外,在本发明的一个实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞能够产生克隆 CFU-F。

[0189] 在一个实施例中,大比例的STRO-1<sup>+</sup>多能细胞优选能够分化成至少两种不同生殖系。多能细胞可以发展成的谱系的非限制性实例包括 骨前体细胞;肝细胞祖细胞,其具有胆道上皮细胞和肝细胞的多潜能;神经限制细胞,其可以产生会发展成少突胶质细胞和星形胶质细胞的 神经胶质细胞前体;神经元前体,其会发展出神经元;心肌和心肌细胞、葡萄糖反应性胰岛素分泌腺β细胞系的前体。其它谱系包括但 不限于成牙质细胞、牙质产生细胞和软骨细胞,以及以下的前体细胞: 视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、皮肤细胞(诸如角化细胞)、树突 状细胞、毛囊细胞、输尿管上皮细胞、平滑肌和骨骼肌细胞、睾丸祖细胞、血管内皮细胞、肌腱、韧带、软骨、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质、心肌、平滑肌、骨骼肌、周细胞、血管、上皮、神经胶质、神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

[0190] 在另一个实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞在培养时不能产生造血细胞。



[0191] 在一个实施例中,细胞是取自欲治疗的受试者,使用标准技术在体外培养并且用于获得上清液或可溶性因子或扩增细胞以自体或同种异体组合物形式施用至受试者。在可选实施例中,使用一种或多种已建立的人细胞系的细胞。在另一适用实施例中,使用非人动物的细胞(或者如果患者不是人,而来自于另一物种)。

[0192] 本发明还涵盖使用由自体外培养物产生的STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细胞(后者也称为扩增细胞)获得或得到的上清液或可溶性因子。本发明的扩增细胞根据培养条件(包括培养基中刺激因子的数量和/或类型)、传代次数等可以具有多种表型。在某些实施例中,子代细胞是在从亲本群体传代约2次、约3次、约4次、约5次、约6次、约7次、约8次、约9次或约10次后获得。然而,子代细胞可以在从亲本群体传代任何次后获得。

[0193] 子代细胞可以通过在任何适合培养基中培养而获得。如本文在提及细胞培养时使用的术语“培养基”包括细胞周围环境的组分。培养基可以是固体、液体、气态或相和材料的混合物。培养基包括液体生长培养基以及不供养细胞生长的液体培养基。培养基也包括胶状培养基,诸如琼脂、琼脂糖、明胶和胶原蛋白基质。示例性气态培养基包括在皮氏培养皿(petri dish)或其它固体或半固体支持物上生长的细胞所暴露的气相。术语“培养基”也指意欲用于细胞培养中的材料,即使其尚未与细胞接触。换句话说,制备用于细菌培养的富营养液体是培养基。当与水或其它液体混合时变得适于细胞培养的粉末混合物可称为“粉状培养基”。

[0194] 在一个实施例中,适用于本发明方法的子代细胞是通过使用经过STRO-3抗体标记的磁性珠粒从骨髓分离或富集TNAP<sup>+</sup>STRO-1<sup>+</sup>细胞,并接着培养扩增所分离的细胞来获得(关于适合培养条件的实例,请参见Gronthos等Blood 85:929-940,1995)。

[0195] 在一个实施例中,所述扩增细胞(子代)(例如至少在5次传代后)可以是TNAP<sup>-</sup>、CC9<sup>+</sup>、I<sup>+</sup>类HLA、II<sup>-</sup>类HLA、CD14<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、CD11a<sup>-</sup>c<sup>-</sup>、CD31<sup>-</sup>、CD86<sup>-</sup>、CD34<sup>-</sup>和/或CD80<sup>-</sup>。然而,在与本文所述不同的培养条件下,不同标志物的表达有可能会变化。此外,虽然具有这些表型的细胞可在扩增细胞群体中占优势,但这并不指较小比例的细胞不具有此表型(例如,小百分比的扩增细胞可以是CC9<sup>-</sup>)。在一个实施例中,扩增细胞仍具有分化成不同细胞类型的能力。

[0196] 在一个实施例中,用于获得上清液或可溶性因子或细胞本身的扩增细胞群体包含其中至少25%(如至少50%的细胞)的细胞是CC9<sup>+</sup>。

[0197] 在另一实施例中,用于获得上清液或可溶性因子或细胞本身的扩增细胞群体包含其中至少40%(如至少45%的细胞)的细胞是STRO-1<sup>+</sup>。

[0198] 在另一实施例中,扩增细胞可表达一种或多种全体或个别地选自由以下组成的组的标志物:LFA-3、THY-1、VCAM-1、ICAM-1、PECAM-1、P-选择蛋白、L-选择蛋白、3G5、CD49a/CD49b/CD29、CD49c/CD29、CD49d/CD29、CD90、CD29、CD18、CD61、整联蛋白β6-19、血栓调节蛋白、CD10、CD13、SCF、PDGF-R、EGF-R、IGF1-R、NGF-R、FGF-R、瘦蛋白-R(STRO-2=瘦蛋白-R)、RANKL、STRO-4(HSP-90P)、STRO-1<sup>亮</sup>和CD146或这些标志物的任何组合。

[0199] 在一个实施例中,子代细胞是如WO 2006/032092中所定义和/或所述的多能扩增STRO-1<sup>+</sup>多能细胞子代(MEMP)。制备可用于得到子代的STRO-1<sup>+</sup>多能细胞的富集群体的方法描述于WO 01/04268和WO 2004/085630中。在体外情形中,STRO-1<sup>+</sup>多能细胞极少以绝对纯制备物形式存在,而是一般与作为组织特异性定向细胞(TSCC)的其它细胞一起存在。WO

01/04268提出以约0.1%至90%的纯度水平从骨髓采集所述细胞。包含可得到子代的MPC的群体可直接从组织来源采集,或者其可为已在离体扩增的群体。

[0200] 例如,子代可获自大致上纯化的STRO-1<sup>+</sup>多能细胞的已采集且未扩增的群体,其构成其所存在的群体总细胞的至少约0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或95%。此水平可以通过例如选择对至少一种个别地或全体选自TNAP、STRO-4 (HSP-90P)、STRO-1<sup>亮</sup>、3G5<sup>+</sup>、VCAM-1、THY-1、CD146和STRO-2组成的组的标志物呈阳性的细胞来实现。

[0201] MEMPS与新鲜采集的STRO-1<sup>+</sup>多能细胞的区别之处可在于其对于标志物STRO-1<sup>亮</sup>呈阳性且对于标志物碱性磷酸酶(ALP)呈阴性。相比之下,新鲜分离的STRO-1<sup>+</sup>多能细胞对于STRO-1<sup>亮</sup>和ALP两者都呈阳性。在本发明的一个实施例中,至少15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的所施用细胞具有表型STRO-1<sup>亮</sup>、ALP<sup>-</sup>。在另一实施例中,MEMPS对于标志物Ki67、CD44和/或CD49c/CD29、VLA-3、 $\alpha$ 3 $\beta$ 1中的一种或多种呈阳性。在另一实施例中,MEMP不显示TERT活性和/或对于标志物CD18呈阴性。

[0202] STRO-1<sup>+</sup>细胞起始群体可源自WO 01/04268或WO 2004/085630中所述的任一种或多种组织类型,即骨髓、牙髓细胞、脂肪组织和皮肤,或许更广泛来说来自脂肪组织、牙齿、牙髓、皮肤、肝、肾、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、脾、淋巴结、胸腺、胰、骨、韧带、骨髓、肌腱和骨骼肌。

[0203] 应理解,在进行本发明中所述的方法时,带有任何指定细胞表面标志物的细胞的分离可以通过多种不同方法来实现,然而,示例性方法依赖于结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)与所关注标志物的结合,随后分离显示结合(为高水平结合或低水平结合)或不结合的那些细胞。最适宜结合剂为抗体或基于抗体的分子,例如单克隆抗体或基于单克隆抗体的分子(例如包含其抗原结合片段的蛋白质),因为后面所说的这些结合剂具有特异性。抗体在两个步骤中都可使用,然而也可以使用其它试剂,因此这些标志物的配体也可以用于富集带有所述标志物或缺乏所述标志物的细胞。

[0204] 抗体或配体可连接至固体支持物以允许粗分离。在一个实施例中,分离技术最大程度地保持欲收集的部分的活力。具有不同功效的各种技术可用于获得相对较粗的分离。所用特定技术将取决于分离效率、相关细胞毒性、执行的容易性和速度,以及复杂设备和/或技术技能的必要性。分离程序可包括但不限于使用涂有抗体的磁性珠粒的磁性分离、亲和色谱和利用连接至固体基质的抗体的“淘选”。提供精确分离的技术包括但不限于FACS。执行FACS的方法对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

[0205] 针对本文所述的各标志物的抗体可商购获得(例如抗STRO-1的单克隆抗体可从R&D Systems,USA商购获得)、从ATCC或其它保藏组织获得和/或可使用业内公认的技术产生。

[0206] 在一个实施例中,分离STRO-1<sup>+</sup>细胞的方法例如包括第一步骤,其为利用例如识别STRO-1的高水平表达的磁性活化细胞分选(MACS)的固相分选步骤。接着必要时可进行第二分选步骤以得到更高水平的前体细胞表达,如专利说明书WO 01/14268中所述。此第二分选步骤可能涉及使用两种或更多种标志物。

[0207] 获得STRO-1<sup>+</sup>细胞的方法还可能包括使用已知技术进行第一富集步骤之前采集细胞来源。因此,组织将以手术方式移除。接着将构成来源组织的细胞分离为所谓单细胞

悬浮液。此分离可以通过物理和 或酶学方式达成。

[0208] 一旦获得了适合的STRO-1<sup>+</sup>细胞群体,就可以通过任何适合方式 对其进行培养或扩增以获得MEMP。

[0209] 在一个实施例中,细胞是取自欲治疗的受试者,使用标准技术在 体外培养并且用于获得上清液或可溶性因子或扩增细胞以自体或同 种异体组合物形式施用至受试者。在可选实施例中,使用一种或多种 已建立的人细胞系的细胞来获得上清液或可溶性因子。在另一适用实 施例中,使用非人动物的细胞(或者如果患者不是人,则来自另一物 种)来获得上清液或可溶性因子。

[0210] 本发明可以使用来自任何非人动物物种的细胞加以实施,包括但 不限于非人灵长类动物细胞、有蹄类动物、犬科动物、猫科动物、兔 类动物、啮齿动物、鸟类动物和鱼类动物细胞。可用于实施本发明的 灵长类动物细胞包括但不限于黑猩猩、狒狒、食蟹猕猴和任何其它新 世界或旧世界猴类的细胞。可用于实施本发明方法的有蹄类动物细胞 包括但不限于牛、猪、绵羊、山羊、马、水牛和野牛的细胞。可用于 实施本发明方法的啮齿动物细胞包括但不限于小鼠、大鼠、天竺鼠、 仓鼠和沙鼠细胞。可用于实施本发明方法的兔类动物物种 的实施例包 括家兔、长腿大野兔、野兔、棉尾兔、雪地兔和鼠兔。鸡(原鸡(Gallus gallus)) 为可用于实施本发明的方法的鸟类物种的一个实例。

[0211] 在一个实施例中,细胞是人细胞。

[0212] 适用于本发明方法的细胞在使用前或获得上清液或可溶性因子 前可储存。保藏和储存真核细胞和尤其哺乳动物细胞的方法和方案在 本领域中是已知的(参见例如 Pollard,J.W.和Walker,J.M.(1997) Basic Cell Culture Protocols,第二版,Humana Press,Totowa,N.J.; Freshney,R.I.(2000) Culture of Animal Cells,第四版,Wiley-Liss, Hoboken,N.J.)。维持所分离的干细胞(诸如间充质干细胞/祖细胞)或其 子代的生物活性的任何方法都可以结合本发明来使用。在一个实施例 中,通过使用低温保藏来维持和储存细胞。

#### [0213] 遗传修饰细胞

[0214] 在一个实施例中,对STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细胞进行遗传修 饰,例如,以表达和/或分泌相关蛋白质。例如,细胞被工程改造来 表达在治疗运动障碍或其它中风的影响中有用的蛋白质,如例如在 Meade等,J Exp Stroke Transl Med 2:22-40,2009中描述的神经生长 因子或多肽。

[0215] 遗传修饰细胞的方法对于本领域的技术人员来说是显而易见的。例如,使欲在细胞中表达的核酸可操作地连接至用于在细胞中诱导表 达的启动子。例如,将核酸连接至可在受试者的多种细胞中可操作的 启动子,诸如病毒启动子,例如CMV启动子(例如CMV-IE启动子) 或SV-40启动子。其它适合启动子在本领域中是已知的并且应理解为 在作了必要修改的情况下适用于本发明的实施例。

[0216] 在一个实施例中,核酸以表达构建体的形式提供。如本文所用, 术语“表达构建体”是指具有在细胞中将表达赋予到可操作地连接的 核酸(例如报道基因和/或可反选择的报道基因)的能力的核酸。在本发 明的上下文中,应了解,表达构建体可包含或为质粒、噬菌体、噬菌 粒、粘粒、病毒亚基因组或基因组片段或能够以可表达格式维持和/ 或复制异源DNA的其它核酸。

[0217] 构建适用于实施本发明的表达构建体的方法对于本领域的技术人员来说将是显而易见的并且描述于以下文献中:例如Ausubel等(见:Current Protocols in Molecular Biology.Wiley Interscience,ISBN 047 150338,1987)或Sambrook等(见:Molecular Cloning:Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories,New York,第三版2001)。例如,使用例如PCR从适合模板核酸扩增表达构建体的各组分并随后克隆至适合的表达构建体(诸如质粒或噬菌粒)中。

[0218] 适于所述表达构建体的载体在本领域中是已知的和/或在本文中描述。例如,适于哺乳动物细胞中的本发明方法中使用的表达载体为例如由Invitrogen供应的pcDNA载体套装的载体、pCI载体套装的载体(Promega)、pCMV载体套装的载体(Clontech)、pM载体(Clontech)、pSI载体(Promega)、VP 16载体(Clontech)或pcDNA载体套装的载体(Invitrogen)。

[0219] 本领域的技术人员将认识到其它载体和所述载体的来源,诸如Life Technologies公司、Clontech或Promega。

[0220] 用于将分离的核酸分子或包含所述核酸的基因构建体引入细胞中用于表达的方式对于本领域的技术人员来说是已知的。用于指定生物体的技术取决于已知的成功技术。用于将重组DNA引入细胞中的方式包括显微注射、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体(诸如使用lipofectamine(Gibco,MD,USA)和/或cellfectin(Gibco,MD,USA))介导的转染、PEG介导的DNA吸收、电穿孔和微粒轰击(诸如使用涂有DNA的钨粒子或金粒子(Agracetus Inc.,WI,USA))以及其它方式。

[0221] 或者,本发明的表达构建体是病毒载体。适合病毒在本领域中是已知的并且可商购获得。用于递送核酸和使所述核酸整合至宿主细胞基因组中的常规基于病毒的系统包括例如逆转录病毒载体、慢病毒载体或腺相关病毒载体。或者,腺病毒载体适用于将保持游离形式的核酸引入宿主细胞中。病毒载体为靶细胞和组织中基因转移的有效且通用的方法。另外,已在多种不同细胞类型和靶组织中观察到高转导效率。

[0222] 例如,逆转录病毒通常包含包装能力高达6-10kb外来序列的顺式作用长末端重复(LTR)。最小顺式作用LTR就足以用于载体的复制和包装,其接着用于将表达构建体整合至靶细胞中以提供长期表达。广泛使用的逆转录病毒载体包括基于以下病毒的载体:鼠类白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SrV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和其组合(参见例如Buchscher等,J Virol. 56:2731-2739(1992);Johann等,J.Virol.65:1635-1640(1992);Sommerfelt等,Virol.76:58-59(1990);Wilson等,J.Virol.63:274-2318(1989);Miller等,J.Virol.65:2220-2224(1991);PCT/US94/05700;Miller和Rosman BioTechniques 7:980-990,1989;Miller,A.D.Human Gene Therapy 7:5-14,1990;Scarpa等Virology 75:849-852,1991;Burns等Proc.Natl.Acad.Sci USA 90:8033-8037,1993)。

[0223] 已开发各种腺相关病毒(AAV)载体系统用于核酸递送。AAV载体可以使用本领域中已知的技术容易地构建。参见例如美国专利号5,173,414和5,139,941;国际公布号W0 92/01070和W0 93/03769;Lebkowski等Molec.Cell.Biol.5:3988-3996,1988;Vincent等(1990) Vaccines 90(Cold Spring Harbor Laboratory Press);Carter Current Opinion in Biotechnology 5:533-539,1992;Muzyczka.Current Topics in Microbiol,

and Immunol.755:97-129,1992;Kotin,Human Gene Therapy 5:793-801,1994;Shelling和Smith Gene Therapy 7:165-169,1994;和 Zhou等J Exp.Med.779:1867-1875,1994。

[0224] 适用于递送本发明的表达构建体的其它病毒载体包括例如来源于痘病毒家族的载体,诸如牛痘病毒和禽痘病毒或 $\alpha$ 病毒或缀合病毒载体(例如Fisher-Hoch等,Proc.Natl Acad.Sci.USA 56:317-321,1989 中所述的载体)。

[0225] 细胞和可溶性因子的治疗/预防潜能的测定

[0226] 用于确定细胞或可溶性因子改善大脑功能和/或治疗运动障碍和/或使大脑神经元再生的能力的方法对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

[0227] 例如,将细胞或可溶性因子与神经元一起培养,并且评估细胞或可溶性因子诱导轴突生长的能力,例如,显微技术。类似的测定可以在体内通过注射细胞和/或可溶性因子至鸡胚的脑中并且评估轴突的生长来进行,例如,如本文所例举的。

[0228] 在一个实施例中,在与细胞和/或可溶性因子一起培养时或之前将神经元暴露在氧和/或葡萄糖剥夺下。氧和葡萄糖剥夺是一种缺血模型。

[0229] 在另一个实施例中,细胞在诱导神经元分化的条件下生长,例如包含叔丁基羟基茴香醚和丙戊酸或5-氮杂胞苷或吲哚美辛和异丁基甲基黄嘌呤和胰岛素。分化成神经元的细胞被认为适用于治疗。

[0230] 在又一个实施例中,将细胞或可溶性因子(例如,(例如通过亲和纯化或色谱得到的)因子或单个因子或因子片段的混合物)施用于中风模型,并且对大脑功能、大脑神经元再生和/或运动障碍的影响进行评估。

[0231] 存在各种已知的技术用于诱导非人动物受试者的缺血性中风,如,主动脉/腔静脉闭塞、外颈部止血带或箍、出血或低血压、颅内高压或颈总动脉闭塞、两-血管闭塞和低血压、四-血管闭塞、单侧颈总动脉闭塞(仅在某些物种中)、内皮素-1诱导的动脉和静脉收缩、大脑中动脉闭塞、自发脑梗塞(自发性高血压大鼠)、巨球栓塞、血液凝块栓塞或微球栓塞。出血性中风可以通过向脑部输注胶原酶而建模。

[0232] 在一个实施例中,中风模型包括大脑中动脉闭塞来产生缺血性中风。

[0233] 为了测试群和/或子代和/或分泌因子治疗中风的影响的能力,将群和/或子代和/或分泌因子在诱导中风之后施用,例如,在中风的1小时至1天内。在施用后对大脑功能和/或运动障碍进行几次评估。

[0234] 评估大脑功能和/或运动障碍的方法对于本领域的技术人员来说将是显而易见的并且包括,例如转棒、高架十字迷宫、开场实验、Morris水迷宫、T-迷宫、八臂迷宫、运动评估(例如,在一定时间内覆盖的面积)、甩尾或De Ryck's行为测试(De Ryck等.,Stroke. 20:1383-1390,1989)。额外的测试对于本领域的技术人员将是显而易见的和/或是本文所描述的。

[0235] 在另一个实施例中,群和/或子代和/或分泌因子对大脑的效果通过成像来评估。例如,细胞凋亡、自噬和神经血管单元可以通过体内光学成像来检测(Liu等.,Brain Res.2011年4月27日),并且可以使用PET、MRI或CT来评估各种因素,如梗塞的大小、半暗带尺寸和/或脑损伤的程度。

[0236] 还评估了群和/或子代和/或分泌因子对大脑神经元的效果。例如,将脑或其大脑的一个区域移除,并且评估或估计神经元的数目或神经元的子型。根据所使用的模型,这

个数目可以与对照动物中的数目相比较,或者如果仅诱导了局灶性缺血,那么与同一动物的脑部对照区域相比较。

#### [0237] 细胞组合物

[0238] 在本发明的一个实施例中,STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细胞是以组合物形式施用。在一个实施例中,所述组合物包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0239] 术语“载体”和“赋形剂”是指在本领域中常规用于促进活性化合物的储存、施用和/或生物活性的物质的组合物(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Mac Publishing Company(1980)。载体还可减少活性化合物的任何不当副作用。适合载体例如是稳定的,例如不能与载体中的其它成分反应。在一个实施例中,载体在用于治疗的剂量和浓度下在接受者体内不产生明显的局部或全身性不良作用。

[0240] 适用于本发明的载体包括那些常规使用的载体,例如水、盐水、右旋糖水溶液、乳糖、林格氏溶液(Ringer's solution)、缓冲溶液、透明质酸和二醇是示例性液体载体,特别是(当等渗时)对于溶液来说。适合药用载体和赋形剂包括淀粉、纤维素、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、氯化钠、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0241] 在另一实施例中,载体是介质组合物,例如细胞在其中生长或悬浮的介质组合物。在一个实施例中,所述介质组合物不在其所施用的受试者中诱发任何不良作用。

[0242] 示例性介质和赋形剂不会不利地影响细胞活力和/或细胞减少、预防或延迟中风的影响的能力。

[0243] 在一个实施例中,载体或赋形剂提供缓冲活性以使细胞和/或可溶性因子维持在适合pH下,由此发挥生物活性,例如载体或赋形剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。PBS代表一种有吸引力的载体或赋形剂,因为其于细胞和因子相互作用的程度最低并且允许快速释放细胞和因子,在这种情况下,可将本发明的组合物制造为用于例如通过注射直接施加至血流或组织或围绕组织或与组织相邻的区域中的液体。

[0244] STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细胞也可以并入或包埋于与接受者相容并且降解为对接受者无害的产物的骨架中。所述骨架提供对欲移植到接受受试者体内的细胞的支持和保护。天然和/或合成生物可降解性骨架为所述骨架的实例。

[0245] 多种不同的骨架可成功用于实施本发明。示例性骨架包括但不限于生物可降解的骨架。天然生物可降解骨架包括胶原蛋白、纤连蛋白和层连蛋白骨架。适用于细胞移植骨架的合成材料应能够支持广泛细胞生长和细胞功能。所述骨架也可被吸收。适合骨架包括聚乙醇酸骨架,例如如Vacanti等,J.Ped.Surg.23:3-9 1988;Cima等,Biotechnol.Bioeng.35:145 1991;Vacanti等,Plast.Reconstr.Surg.88:153-9 1991所述,或合成聚合物,诸如聚酸酐、聚原酸酯和聚乳酸。

[0246] 在另一实施例中,细胞可在凝胶骨架(诸如来自Upjohn公司的Gelfoam)中施用。

[0247] 适用于本文所述方法的细胞组合物可以单独施用或作为与其它细胞的混合物施用。可结合本发明组合物施用的细胞包括但不限于其它多效或多能细胞或干细胞,或骨髓细胞。不同类型的细胞可在临施用前或施用前不久与本发明组合物混合,或者其可以在施用前一起共培养一段时间。

[0248] 在一个实施例中,组合物包含有效量或治疗或预防有效量的细胞。例如,组合物

包含约 $1 \times 10^5$ 个STRO-1<sup>+</sup>细胞/kg至约 $1 \times 10^7$ 个 STRO-1<sup>+</sup>细胞/kg或约 $1 \times 10^6$ 个STRO-1<sup>+</sup>细胞/kg至约 $5 \times 10^6$ 个 STRO-1<sup>+</sup>细胞/kg。有待施用的细胞的确切量取决于多种因素,包括患者的年龄、体重和性别以及中风的范围和严重程度和/或中风的部位。

[0249] 在一个实施例中,将低剂量细胞施用至受试者。示例性剂量包括 每公斤约 $0.1 \times 10^4$ 和 $0.5 \times 10^6$ 之间个细胞,例如每公斤约 $0.1 \times 10^5$ 和  $0.5 \times 10^6$ 之间个细胞,诸如每公斤约 $0.5 \times 10^5$ 和 $0.5 \times 10^6$ 之间个细胞, 例如每公斤约 $0.1 \times 10^6$ 和 $0.5 \times 10^6$ 之间个细胞,例如每公斤约 $0.2 \times 10^6$ 或 $0.3 \times 10^6$ 或 $0.4 \times 10^6$ 个细胞。

[0250] 在一些实施例中,细胞是含于不允许细胞离开进入受试者循环 中,然而允许由细胞分泌的因子进入循环中的腔室中。以此方式,可 通过允许细胞分泌因子进入受试者循环中来向受试者施用可溶性因 子。所述腔室同样可植入受试者的某一部位以增加可溶性因子的局部 水平,例如在胰腺中或其附近植入

[0251] 在本发明的一些实施例中,可不必或不需要在起始细胞组合物疗 法前对患者进行免疫抑制。因此,移植同种异体或者甚至异种的 STRO-1<sup>+</sup>细胞或其子代在一些情况下可能是耐受的。

[0252] 然而,在其它情况下,在起始细胞疗法前以药理学方式对患者进 行免疫抑制和/或针对细胞组合物减少受试者的免疫反应可能是需要 或适当的。这可以通过使用全身性或局部免疫抑制剂来实现,或者这 可以通过在囊封装置中递送细胞来实现。细胞可以囊封在细胞所需要 的营养物和氧以及治疗因子可透过,而细胞不可透过的胶囊中来免疫 体液因子和细胞。在一个实施例中,囊封剂具有低变应原性,容易地 且稳定地位于靶组织中,并且对所植入的结构提供附加保护。降低或 消除对移植细胞的免疫反应的这些和其它方式在本领域中是已知的。作为替代,可对细胞进行遗传修饰以降低其免疫原性。

#### [0253] 可溶性因子的组合物

[0254] 在本发明的一个实施例中,由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到和/或由子代细 胞得到的上清液或可溶性因子是以例如包含适合载体和/或赋形剂的 组合物形式施用。在一个实施例中,载体或赋形剂不会不利地影响可 溶性因子或上清液的生物学作用。

[0255] 在一个实施例中,组合物包含稳定可溶性因子或上清液组分(例 如蛋白酶抑制剂)的物质的组合物。在一个实施例中,所包括的蛋白 酶抑制剂的量不足以对受试者产生不良影响。

[0256] 包含由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到和/或由子代细胞得到的上清液或可溶 性因子的组合物可制备为适当液体悬浮液,例如于培养基或于稳定载 体或缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)中的悬浮液。适合载体在上文中 描述。在另一实施例中,包含由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到和/或由子代细胞 得到的上清液或可溶性因子的悬浮液是用于注射的油性悬浮液。适合 亲脂性溶剂或媒剂包括脂肪油,诸如芝麻油;或合成脂肪酸酯,诸如 油酸乙酯或甘油三酯;或脂质体。欲用于注射的悬浮液也可含有增加 悬浮液的粘度的物质,诸如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或聚葡萄糖。 任选地,悬浮液也可含有适合的稳定剂或增加化合物的溶解度以允许 制备高度浓缩溶液的试剂。

[0257] 可以通过在具有上述成分之一或其组合的适当溶剂中并入所需 量的上清液或可溶性因子,需要时随后过滤灭菌来制备无菌注射溶 液。

[0258] 一般来说,通过将上清液或可溶性因子并入含有基本分散介质或 来自以上列出

成分的其它所需成分的无菌媒剂中来制备分散液。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下, 示例性制备方法是真空干燥和冷冻干燥, 此举产生活性成分加来自其先前无菌过滤溶液的任何其它所需成分的粉末。根据本发明的替代方面, 上清液或可溶性因子可以与一种或多种增强它的溶解度的其它化合物一起配制。

[0259] 其它示例性载体或赋形剂描述于以下文献中: 例如Hardman等, (2001) Goodman和Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams以及Wilkins, New York, N.Y.; Avis等, (编著) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman等, (编著) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman等, (编著) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner和Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.。

[0260] 治疗组合物通常应无菌且在制造和储存条件下稳定。组合物可配制成溶液、微乳液、脂质体或其它有序结构。载体可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其适合混合物的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣(诸如卵磷脂)、在分散液的情况下通过维持所需粒度和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。在许多情况下, 希望在组合物中包括等渗剂, 例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如单硬酯酸盐和明胶)来达成。此外, 可溶性因子可以于时间释放制剂中施用, 例如于包括缓慢释放聚合物的组合物中施用。活性化合物可用保护化合物免于快速释放的载体制备, 诸如控制释放制剂, 包括植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容性聚合物, 诸如聚乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯、聚乳酸和聚乳酸聚乙醇酸共聚物(PLG)。多种用于制备所述制剂的方法已获得专利或通常为本领域的技术人员所已知。

[0261] 上清液或可溶性因子可与例如提供可溶性因子的缓慢释放的适当基质组合施用。

[0262] 组合物的附加组分

[0263] STRO-1<sup>+</sup>细胞得到的上清液或可溶性细胞因子、STRO-1<sup>+</sup>细胞或其子代可以与其它有益的药物或生物分子(生长因子、营养因子)一起施用。当与其它药剂一起施用时, 它们可以在单一药物组合物中、或在分开的药物组合物中、与其它药剂同时或按序(在施用其它药剂之前或之后)一起施用。可以共施用的生物活性因子包括抗细胞凋亡剂(例如EPO、EPO模拟体、TPO、IGF-I和IGF-II、HGF、半胱氨酸蛋白酶抑制剂); 消炎药(例如, p38 MAPK抑制剂、TGF-β抑制剂、他汀类、IL-6和IL-1抑制剂、PEMIROLAST、TRANLAST、REMICADE、SIROLIMUS, 以及NSAID(非类固醇消炎药, 例如TEPOXALIN、TOLMETIN、SUPROFEN); 免疫抑制/免疫调节剂(例如钙调神经磷酸酶抑制剂, 例如环孢素、他克莫司; mTOR抑制剂(例如, SIROLIMUS、EVEROLIMUS); 抗增生剂(例如, 咪唑硫嘌呤、霉酚酸酯); 皮质类固醇(例如, 泼尼松龙、氢化可的松); 抗体例如单克隆抗-IL-2α受体抗体(例如, 巴利昔单抗、达克珠单抗)、多克隆抗T细胞抗体(例如抗胸腺细胞球蛋白(ATG); 抗淋巴细胞球蛋白(ALG); 单克隆抗T细胞抗体OKT3); 抗血栓形成剂(例如, 肝素、肝素衍生物、尿激酶、PPack(右旋苯基



丙氨酸脯氨酸精氨酸氯甲基酮)、抗凝血酶化合物、血小板受体拮抗剂、抗凝血酶抗体、抗血小板受体抗体、阿司匹林、双嘧达莫、鱼精蛋白、水蛭素、前列腺素抑制剂和血小板抑制剂);和抗氧化剂(例如普罗布考、维生素A、抗坏血酸、生育酚、辅酶Q-10、谷胱甘肽、L-半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸),以及局部麻醉剂。

[0264] 在一个实施例中,如本文根据任何实施例描述的组合物包含用于改善大脑功能和/或使大脑神经元再生和/或治疗运动障碍的附加因子,例如,神经生长因子。

[0265] 或者或另外,如本文根据任何实施例描述的细胞、分泌因子和/或组合物与中风影响的已知治疗组合,例如,物理疗法和/或语言疗法。

[0266] 在一个实施例中,如本文根据任何实施例描述的药物组合物包含用于治疗中风的影响的化合物。或者,如本文根据本发明的任何实施例描述的治疗/预防的方法另外包括施用用于治疗中风的影响的化合物。示例性化合物在本文描述并且应理解为在作了必要的修改的情况下适用于本发明的这些实施例。

[0267] 在另一个实施例中,如本文根据任何实施例描述的组合物另外包含诱导或增强祖细胞分化为血管内皮细胞的因子。示例性因子包括血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF,例如PDGF-BB)以及FGF。

[0268] 在另一个实施例中,如本文根据任何实施例描述的组合物另外包含组织特异性定向细胞(TSCC)。在这方面,国际专利申请号PCT/AU2005/001445示范了施用TSCC和STRO-1<sup>+</sup>细胞可以使得TSCC的增殖增强。在一个实施例中,TSCC是血管细胞。对受试者施用所述组合物可以导致血管的产生增加,例如导致被递送至受影响组织的营养成分增加。

#### [0269] 医疗装置

[0270] 本发明还提供了用于使用或当在如本文根据任何实施例描述的方法中使用时的医疗装置。例如,本发明提供包含如本文根据任何实施例描述的STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代和/或其可溶性因子和/或组合物的注射器或导管或其它合适的递送装置。任选地,注射器或导管与如本文根据任何实施例描述的方法的说明书一起包装。

[0271] 在另一个实施例中,本发明提供包含如本文根据任何实施例描述的STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代和/或其可溶性因子和/或组合物的植入物。任选地,植入物与如本文根据任何实施例描述的方法的说明书一起包装。合适的植入物可以形成为具有支架,例如如上文所述,和STRO-1<sup>+</sup>细胞和/或其子代细胞和/或其可溶性因子。

#### [0272] 施用模式

[0273] 由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到的上清液或可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>细胞或其子代可手术植入、注射、递送(例如借助于导管或注射器)或以其它方式直接或间接施用至需要修复或增强的部位(例如器官)或施用至脂肪垫中。

[0274] 在一个实施例中,由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到的上清液或可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>细胞或其子代是递送至受试者的血流中。例如,由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到的上清液或可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>细胞或其子代是以肠胃外方式递送。肠胃外施用的示例性途径包括但不限于腹腔、脑室、脑室内、鞘内或静脉内。在一个实施例中,由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到的上清液或可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>细胞或其子代是动脉内递送至主动脉中、心脏的心房或心室中或血管中,例如静脉内。

[0275] 在细胞递送至心脏的心房或心室的情况下,可以将细胞施用至左心房或左心室

以避免可能由细胞快速递送至肺而引起的并发症。

[0276] 在一个实施例中,群和/或子代和/或可溶性因子是施用至颈动脉内。

[0277] 在一个实施例中,群和/或子代和/或可溶性因子是施用至受试者的脑中,例如,颅内。例如,将群和/或细胞和/或可溶性因子施用至大脑和/或任选至纹状体。

[0278] 在一个实施例中,将群和/或细胞和/或可溶性因子施用至缺血部位和/或缺血部位的周边。所述部位可以使用本领域已知的方法来确定,例如磁共振成像和/或计算机断层扫描和/或超声。

[0279] 用于治疗性制剂的施用方案的选择取决于若干因素,包括实体的血清或组织周转率、症状水平和实体的免疫原性。

[0280] 在一个实施例中,由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到的上清液或可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>细胞或其子代是以单次推注剂量来递送。或者通过连续输注、或通过间隔为例如一天、一周或每周1-7次的剂量来施用由STRO-1<sup>+</sup>细胞得到的上清液或可溶性因子、STRO-1<sup>+</sup>细胞或其子代。示例性剂量方案是涉及最大剂量或避免明显不当副作用的剂量频率的方案。总每周剂量取决于所使用因子/细胞的类型和活性。适当剂量由临床医师例如使用本领域中已知或怀疑影响治疗或预测影响治疗的参数或因素来确定。一般来说,剂量始于稍小于最佳剂量的量并在此后以较小增量增加直至相对于任何负面副作用达成所需或最佳的效果。

[0281] 本发明包括以下非限制性实施例。

## 实施例

[0282] 实施例1:通过选择STRO-3<sup>+</sup>细胞对MPC进行免疫选择

[0283] 骨髓(BM)是从健康正常的成人志愿者(20-35岁)中采集。简单地说,从髂后嵴抽取40ml BM至含肝素锂抗凝剂的试管中。

[0284] 如先前所述(Zannettino,A.C.等(1998)Blood 92:2613-2628)使用Lymphoprep™(Nycomed Pharma,Oslo,Norway)通过密度梯度分离制备BMMNC。在4℃下以400×g离心30分钟后,用转移吸管移除白细胞层并在由含有5%胎牛血清(FCS;CSL Limited,Victoria,Australia)的汉克氏平衡盐溶液(HBSS;Life Technologies,Gaithersburg,MD)构成的“HHF”中洗涤三次。

[0285] 随后如先前所述(Gronthos等(2003)Journal of Cell Science 116: 1827-1835;Gronthos,S.和Simmons,P.J.(1995)Blood 85:929-940)通过磁性活化细胞分选法分离STRO-3<sup>+</sup>(或TNAP<sup>+</sup>)细胞。简单地说,在冰上将约1-3×10<sup>8</sup>个BMMNC在由10%(v/v)正常兔血清于HHF中组成的阻断缓冲液中孵育20分钟。在冰上将细胞与200μl的STRO-3 mAb于阻断缓冲液中的10μg/ml溶液一起孵育1小时。随后通过在400×g下离心将细胞在HHF中洗涤两次。加入山羊抗小鼠γ-生物素(Southern Biotechnology Associates,Birmingham,UK)于HHF缓冲液中的1/50稀释液且在冰上将细胞孵育1小时。如上将细胞在MACS缓冲液(补充有1%BSA、5mM EDTA和0.01%叠氮化钠的无Ca<sup>2+</sup>且无Mn<sup>2+</sup>的PBS)中洗涤两次并重悬于最终体积为0.9ml的MACS缓冲液中。

[0286] 将100μl抗生蛋白链菌素微珠(Miltenyi Biotec;Bergisch Gladbach, Germany)加入细胞悬浮液中且在冰上孵育15分钟。将细胞悬浮液洗涤两次并重悬于0.5ml MACS缓冲液中且随后上样至微型MACS管柱(MS Columns,Miltenyi Biotec)上,并用0.5ml MACS

缓冲液洗涤三次以回收未结合STRO-3mAb的细胞(于2005年12月19日保藏于美国典型培养物中心(American Type Culture Collection;ATCC),保藏编号PTA-7282-参见国际公布号WO 2006/108229)。再加入1ml MACS缓冲液后,由磁体移除管柱并通过正压力分离TNAP<sup>+</sup>细胞。将来自各部分的细胞等分试样用抗生蛋白链菌素-FITC染色并通过流式细胞术评估纯度。

[0287] 实施例2:通过STRO-3mAb选择的细胞是STRO-1<sup>亮</sup>细胞

[0288] 设计实验以证实使用STRO-3mAb作为用于分离细胞STRO-1<sup>亮</sup>细胞的单一试剂的可能性。

[0289] 鉴于STRO-3 (IgG1)的同种型与STRO-1 (IgM)的同种型不同,因此通过双色FACS分析基于与使用MACS程序分离的STRO-1<sup>亮</sup>细胞的共表达评估STRO-3鉴定克隆CFU-F的能力(图1)。点阵直方图表示以列表模式数据形式收集的 $5 \times 10^4$ 个事件。垂直线和水平线设定为小于用在相同条件下处理的同种型匹配对照抗体1B5 (IgG)和1A6.12 (IgM)获得的平均荧光的1.0%的反应性水平。结果表明STRO-1<sup>亮</sup>细胞的较小群体共表达TNAP(右上象限),而其余STRO-1<sup>+</sup>细胞未能与STRO-3mAb反应。随后测定所有四个象限的通过FACS分离的细胞的CFU-F发生率(表1)。

[0290] 表1:通过双色FACS分析基于细胞表面标志物STRO-1和TNAP的共表达富集人骨髓细胞(参考图1)。将FACS分选的细胞在标准克隆条件下在补充有20%FCS的 $\alpha$ MEM中培养。数据表示铺板的每 $10^5$ 个细胞中第14天群落形成细胞(CFU-F)的平均数 $\pm$ SE (n=3个不同骨髓抽吸物)。这些数据表明人MPC仅局限于BM(其明显共表达STRO-1抗原)的TNAP阳性部分。

骨髓部分	每 $10^5$ 个细胞中CFU-F的频率	富集(增加倍数)
[0291] 未分级分离的BMMNC	11.0 $\pm$ 2.2	1.0
TNAP <sup>+</sup> /STRO-1 <sup>亮</sup>	4,511 $\pm$ 185	410
TNAP <sup>+</sup> /STRO-1 <sup>深</sup>	0.0	0.0

[0292] 实施例3:STRO-1<sup>深</sup>和Stro-1<sup>亮</sup>细胞的相对基因和表面蛋白表达

[0293] 在第一系列实验中,采用半定量RT-PCR分析来检验由通过荧光活化细胞分选法分离的STRO-1<sup>深</sup>或STRO-1<sup>亮</sup>群体表达的各种谱系相关基因的基因表达谱(图2A)。在第二系列实验中,采用流式细胞术和平均通道荧光分析来检验由通过荧光活化细胞分选法分离的STRO-1<sup>深</sup>或STRO-1<sup>亮</sup>群体表达的各种谱系相关蛋白质的表面蛋白表达谱。

[0294] 总细胞RNA从 $2 \times 10^6$ 个STRO-1<sup>亮</sup>或STRO-1<sup>深</sup>分选的原代细胞、软骨细胞沉淀和其它诱导的培养物来制备,并且使用RNAzolB提取方法(Biotecx Lab. Inc., Houston, TX)根据制造商的建议来裂解。从各亚群体分离的RNA接着用作cDNA合成的模板,使用第一链cDNA合成试剂盒(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)进行制备。使用如前所述的标准方案(Gronthos等, J. Bone and Min. Res. 74:48-57, 1999)通过PCR扩增来评定各种转录物的表达。此研究中所使用的引物组在表2中示出。扩增后,通过1.5%琼脂糖凝胶电泳对各反应混合物进行分析,并且通过溴化乙锭染色进行观测。通过GAPDH的表达来评定RNA完整性。

[0295] 使用ImageQuant软件参考持家基因GAPDH的表达来评定各细胞标志物的相对基因表达(图2B、图2C)。另外,与STRO-1抗体组合基于多种多样的细胞谱系相关标志物的表达使用双色流式细胞分析来检验离体扩增的MPC的蛋白质表达谱。基于STRO-1<sup>深</sup>和STRO-1<sup>亮</sup>

培养细胞的基因和蛋白质表达的一般表型的概述呈现于表3中。数据表明, 离体扩增的STRO-1<sup>亮</sup>MPC表现出与血管周围细胞相关的标志物(包括血管位蛋白1、VCAM-1、SDF-1、IL-1p、TNF $\alpha$ 以及RANKL) 的差异较高表达。STRO-1<sup>深</sup>和STRO-1<sup>亮</sup>培养细胞的蛋白质与基因表达谱之间的比较总结于表3和表4中。

[0296] 还进行消减杂交研究以鉴别由STRO-1<sup>亮</sup>细胞唯一表达的基因。简单地说, 如上所述分离STRO-1<sup>深</sup>和STRO-1<sup>亮</sup>(参见图3A)。使用RNA STAT-60系统(TEL-TEST)由从5个不同骨髓样本汇集的STRO-1<sup>深</sup>和STRO-1<sup>亮</sup>细胞制备总RNA。使用SMART cDNA合成试剂盒(Clontech Laboratories)进行第一链合成。根据制造商的说明书使用在初始RT过程中形成的3'和5'初始末端上的特定引物位点通过长程PCR(Advantage 2PCR试剂盒;Clontech)扩增所得到的mRNA/单链cDNA杂交体。用RsaI消化STRO-1<sup>亮</sup>cDNA后,使用2个等分试样利用Clontech PCR-Select cDNA消减试剂盒来连接不同特定接头寡核苷酸。根据制造商的方案使用STRO-1<sup>亮</sup>(测试者)和STRO-1<sup>深</sup>(驱赶者)cDNA(且反之亦然)来进行两轮消减杂交。还使用针对STRO-1<sup>亮</sup>驱动cDNA杂交的STRO-1<sup>深</sup>测试cDNA逆向进行此程序。

[0297] 为了鉴别由STRO-1<sup>亮</sup>群体唯一表达的基因,使用STRO-1<sup>亮</sup>消减cDNA来构建包含200个随机选择的、用连接至T/A克隆载体中的STRO-1<sup>亮</sup>消减cDNA转化的细菌克隆的重复低密度微阵列过滤器。随后用[<sup>32</sup>P]dCTP标记的STRO-1<sup>亮</sup>或STRO-1<sup>深</sup>消减cDNA探测微阵列(图3B-3C)。不同筛选鉴别出总共44个克隆,其在STRO-1<sup>深</sup>与STRO-1<sup>亮</sup>亚群体之间高度地差异表达。对所有差异表达的克隆进行的DNA测序揭示,仅1个克隆代表已知的基质细胞有丝分裂原;即,血小板衍生长因子(PDGF)(Gronthos和Simmons, Blood. 85: 929-940, 1995)。有趣的是,发现44个克隆中有6个含有对应于趋化因子基质衍生因子1(SDF-1)的DNA插入。人STRO-1<sup>亮</sup>细胞中SDF-1转录物的高丰度通过从新鲜分选的STRO-1<sup>亮</sup>、STRO-1<sup>深</sup>以及STRO-1<sup>阴性</sup>骨髓亚群体制备的总RNA的半定量RT-PCR得到证实(图3D和表3)。

[0298] 表2. 用于特异性扩增人mRNA的RT-PCR引物和条件

靶标基因	有义/反义(5'-3')引物序列	产品大小
[0299] GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG (SEQ ID NO: 1)	417
	CATGGAGAAGGCTGGGGCTC (SEQ ID NO: 2)	
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC (SEQ ID NO: 3)	364
	GCTGGACTCCTACTGTAAGGG (SEQ ID NO: 4)	

[0300]

<b>IL-1<math>\beta</math></b>	AGGAAGATGCTGGTTCCTCTC (SEQ ID NO: 5) CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC (SEQ ID NO: 6)	151
<b>FLT-1</b>	TCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT (SEQ ID NO: 7) GGTATAAATACACATGTGCTTCTAG (SEQ ID NO: 8)	380
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	TCAGATCATCTTCTCGAACC (SEQ ID NO: 9) CAGATAGATGGGCTCATACC (SEQ ID NO: 10)	361
<b>KDR</b>	TATAGATGGTGTAACCCGGA (SEQ ID NO: 11) TTTGTCAGTACTGAGACAGCTTGG (SEQ ID NO: 12)	450
<b>RANKL</b>	AACAGGCCTTTCAAGGAGCTG (SEQ ID NO: 13) TAAGGAGGGGTTGGAGACCTCG (SEQ ID NO: 14)	538
<b>瘦蛋白</b>	ATGCATTGGGAACCCTGTGC (SEQ ID NO: 15) GCACCCAGGGCTGAGGTCCA (SEQ ID NO: 16)	492
<b>CBFA-1</b>	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA (SEQ ID NO: 17) TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG (SEQ ID NO: 18)	632
<b>PPAR<math>\gamma</math>2</b>	AACTGCGGGGAACTTGGGAGATTCTCC (SEQ ID NO: 18) AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC (SEQ ID NO: 19)	341
<b>OCN</b>	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC (SEQ ID NO: 20) CGTAGAAGCGCCGATAGGC (SEQ ID NO: 21)	289
<b>MyoD</b>	AAGCGCCATCTCTTGAGGTA (SEQ ID NO: 22) GCGAGAAACGTGAACCTAGC (SEQ ID NO: 23)	270
<b>SMMHC</b>	CTGGGCAACGTAGTAAAACC (SEQ ID NO: 24) TATAGCTCATTGCAGCCTCG (SEQ ID NO: 25)	150
<b>GFAP</b>	CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT (SEQ ID NO: 26) TCATCGCTCAGGAGGTCCTT (SEQ ID NO: 27)	370
<b>巢蛋白</b>	GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA (SEQ ID NO: 28) CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT (SEQ ID NO: 29)	460
<b>SOX9</b>	CTCTGCCTGTTTGGACTTTGT (SEQ ID NO: 30) CCTTTGCTTGCTTTTACCTC (SEQ ID NO: 31)	598
<b>X 型胶原</b>	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA (SEQ ID NO: 32) TTTTCCCACTCCAGGAGGGC (SEQ ID NO: 33)	387
<b>聚集蛋白聚糖</b>	CACTGTTACCGCCACTTCCC (SEQ ID NO: 34) ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG (SEQ ID NO: 35)	184

[0301] 表3. STRO-1<sup>亮</sup>和STRO-1<sup>深</sup>群体中相对基因表达的概述。呈现当通过逆转录PCR进行测定时在STRO-1<sup>亮</sup>与STRO-1<sup>深</sup>群体之间显示可测量且差异表达的基因列表。值表示参考持家基因GAPDH的相对基因表达。

[0302]

		相对于 GAPDH 的基因表达
--	--	-----------------

[0303]

组织	标志物	STRO-1 <sup>Bri</sup>	STRO-1 <sup>深</sup>
神经胶质细胞(神经组织内)	GFAP(胶质纤维酸性蛋白)	0.1	0.7
骨	OCN(骨钙素)	1.1	2.5
	OSX(成骨相关转录因子)	0.4	1.3
	CBFA-1(核心因子结合蛋白-1)	0.3	0.6
免疫调节	RANKL(核因子 kB 的受体活化剂)	1.6	0.3
神经保护/神经化学趋化	SDF-1 $\alpha$ (基质细胞源性因子 1- $\alpha$ )	3.2	0.1
脂肪	瘦蛋白	3.1	4.2
心肌细胞	GATA-4	1.1	2.9
内皮细胞	Ang-1(血管生成素-1)	1.5	0.8
软骨细胞	Sox9	0.3	1.1
	COLX(胶原 X)	3.5	2.8
促炎性细胞因子	TNF- $\alpha$ (肿瘤坏死因子 $\alpha$ )	1.7	0.9

[0304] 为使蛋白质表面表达与STRO-1表达的密度相关联,通过胰蛋白酶/EDTA分离制备离体扩增的由骨髓MPC得到的细胞的单细胞悬浮液并且随后与STRO-1抗体与鉴别多种多样细胞谱系相关标志物的抗体的组合一起孵育。使用山羊抗鼠类IgM-异硫氰酸荧光素鉴别 STRO-1,同时使用山羊抗小鼠或抗兔IgG-藻红蛋白鉴别所有其它标志物。对于鉴别细胞内抗原的那些抗体,首先用STRO-1抗体标记细胞制备物,用70%冷乙醇固定以使细胞膜渗透并且接着与细胞内抗原特异性抗体一起孵育。在相同条件下使用同种型匹配对照抗体。使用 COULTER EPICS流式细胞仪进行双色流式细胞分析并且收集列表模式数据。点阵图表示指示各谱系细胞标志物(y轴)和STRO-1(x轴)的荧光强度水平的5,000个列表模式事件。参考同种型匹配阴性对照抗体建立垂直和水平象限。

[0305] 表4. STRO-1<sup>亮</sup>和STRO-1<sup>深</sup>群体中相对蛋白质表达的概述。呈现当通过流式细胞术进行测定时在STRO-1<sup>亮</sup>与STRO-1<sup>深</sup>群体之间显示差异表达的蛋白质的列表。值表示染色的相对平均荧光强度。

[0306]

组织	标志物	平均荧光强度	
		STRO-1 <sup>Bri</sup>	STRO-1 <sup>深</sup>
神经元	神经丝	1.7	20.5
骨	ALK PHOS(碱性磷酸酶)	5.7	44.5
免疫调节	RANKL(核因子 kB 的受体活化剂)	658.5	31.0
上皮细胞	细胞角蛋白 10+13	1.2	23.3
	细胞角蛋白 14	1.8	8.8

[0307]	平滑肌	$\alpha$ -SMA( $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白)	318.0	286.0
	软骨细胞	Byglycan	84.4	65.9
	基底成纤维细胞	肌腱蛋白 C	22.2	6.9
	心肌细胞	肌钙蛋白 C	2.5	15.0

[0308] 实施例4:人牙髓干细胞(hDPSC)分化成神经元

[0309] 分离DPSC和人包皮成纤维细胞

[0310] 将DPSC和人脱落的乳牙(SHED)如Gronthos等,Proc Natl Acad Sci U.S.A 97:13625-13630,2000所述基本上分离。简单地说,从成人(19-35岁)收集丢弃的正常人的第三阻生磨牙或脱落的牙齿(7-8岁),在阿德莱德大学牙科诊所(Dental Clinic of the University of Adelaide)在由阿德莱德大学以及医学和兽医科学人受试者研究委员会(Insititute of Medical and Veterinary Science Human Subjects Research Committees)(H-73-2003)制定的所批准的指导方针下对知情同意的患者进行常规提取。对牙齿表面进行清洁并且使用虎钳使其裂开以露出髓腔。轻轻地将牙髓组织与牙冠和牙根分离,然后在37°C下在3mg/ml的I型胶原酶和4mg/ml的分散酶溶液中消化1小时。通过使细胞经过70- $\mu$ M的滤器来获得单细胞悬浮液。通过以下操作来建立培养:将牙髓的单细胞悬浮液( $1-2 \times 10^5$ )接种至T-25烧瓶中的生长培养基(补充有20%的胎牛血清、100 $\mu$ M的1-抗坏血酸2-磷酸盐、2mM的1-谷氨酰胺、100U/ml青霉素以及100 $\mu$ g/ml链霉素的 $\alpha$ -改良的伊格尔培养基)内,然后在37°C、5%CO<sub>2</sub>下孵育。

[0311] 在父母的知情同意下,通过胶原酶/分散酶消化来自男性新生儿供体的包皮活检组织外植体来分离人包皮成纤维细胞(HFF)。

[0312] 神经诱导测定

[0313] 在室温下用多鸟氨酸(最终浓度10 $\mu$ g/ml)涂布组织培养烧瓶或孔过夜。将烧瓶和孔用水洗涤两次,然后在潮湿的孵化器内在37°C下用层粘连蛋白(最终浓度5 $\mu$ g/ml)涂布过夜。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤烧瓶和孔,然后在添加细胞前用生长培养基洗涤。解冻细胞,并且在T25-涂布的烧瓶中生长直到80%汇合。将细胞以 $1.5 \times 10^5$ 个/孔的密度在2ml/孔的生长培养基中重新接种,在6-孔涂布的板中持续3天,或以 $2 \times 10^3$ 个细胞在8-孔涂布的腔室培养玻片上。然后将细胞在培养基A或培养基B中培养3周。培养基A由Neurobasal A培养基(10888-022;Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)、100U/ml青霉素、1 $\times$ B27补充物、100 $\mu$ g/ml链霉素、20ng/ml表皮生长因子(EGF,100-15;PeproTech,Rocky Hill,NJ,USA)以及40ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(FGF,编号104FGFB01;Prospectany TechnoGene,Rehovot,Israel)组成。培养基B包含三种单独的培养基条件持续3周的时间:第一孵育是培养基A持续7天,接着是在由50:50比率的杜氏改良的伊格尔培养基(DMEM,12100-046;Invitrogen)与F12培养基(21700-075;Invitrogen)、以及胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠补充剂(ITTS,11074547001;Roche Diagnostics,Basel,Switzerland)、100U/ml青霉素、100 $\mu$ g/ml链霉素和40ng/ml的FGF组成的培养基中的改变持续7天。最终7天的孵育由包含50:50比率的DMEM与F12培养基、ITTS、100U/ml青霉素和100 $\mu$ g/ml链霉素、40ng/ml的FGF以及0.5 $\mu$ M维甲酸(RA,R2625;Sigma-Aldrich,St.Louis,USA)的培养基组成。对照样品维持在生长培养基中持续神经元诱导测定的持续时间。所有条件的培养基均每周更换两次。

**[0314] 电生理学**

[0315] 在3周神经元分化测定结束时,用胰蛋白酶释放细胞并且在神经元分化培养基或生长培养基中以 $2 \times 10^4$ 个细胞/500 $\mu$ L的浓度再接种在用盐酸处理的玻璃盖玻片上并且孵育24小时。在室温下使用基于计算机的膜片钳放大器(EPC-9;HEKA Electronics, Lambrecht/Pfalz, Germany)和PULSE软件(HEKA Electronics)进行全细胞膜片钳技术。溶液含有(以mM为单位):NaCl,140;KCl,4;CaCl<sub>2</sub>,2;MgCl<sub>2</sub>,2;葡萄糖,10;以及HEPES,10;用NaOH将pH调节至7.4。为了阻断K<sup>+</sup>通道和分离Na<sup>+</sup>电流,用等摩尔量的Cs谷氨酸和CsCl替换内部溶液中的谷氨酸钾和KCl。将膜片转移吸管从硼硅玻璃中拉出并且用火抛光;转移吸管电阻在2M $\Omega$ -4M $\Omega$ 之间的范围。针对液体接界电势来校正所有示出的电压(对于基于K<sup>+</sup>和Cs<sup>+</sup>的内部溶液相应地为-14mV和-18mV),通过JPCalc(由P.H.Barry博士,University of New South Wales,Sydney,Australia,1994提供)来估计。保持电位自始至终均为-90mV。

**[0316] 禽类胚胎注射**

[0317] 将鸡蛋(白色来亨鸡;HICHICK Breeding Company,Bethal, Australis)纵长地放置在蛋盒内并且在37 $^{\circ}$ C下在潮湿的孵化器中孵育大约40小时以达到注射前的10-12阶段。将绿色荧光蛋白(GFP)-转导的成年人DPSC或HFF( $5 \times 10^3$ 个细胞/L)注射至发育中的禽类胚胎中。将快速绿色染料(2 $\mu$ L)添加至细胞中以在注射程序期间使其可视化。通过用70%乙醇擦拭鸡蛋来制备胚胎,使用针从鸡蛋中提取白蛋白,在鸡蛋的顶部切割一个窗口,并且通过在胚胎下方注射印度墨汁(Winsor和Newton,Middlesex,England)(以1:10在林格氏溶液[1L蒸馏水中7.2g NaCl<sub>2</sub>、0.17g CaCl<sub>2</sub>、0.37g KCl、0.115g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,将pH调节至7.4,过滤除菌]中制备)来使胚胎可视化。将林格氏溶液置于胚胎顶部以保持湿润。用钨丝将卵黄膜从胚胎头部周围去除。将细胞置于玻璃毛细管针(GC100TF-10;SDR Clinical Technology, Sydney,Australia)内,所述针附接至显微操纵器和高压注射器(Narishage, Tokyo),设定在25伏。使用显微操纵器来引导针进入发育中的后脑中直接毗邻菱脑节2的区域。使用附接至高压注射器的脚踏泵将细胞注入胚胎内。移除玻璃针并且将几滴林格氏溶液置于胚胎顶部之上。使用胶带将鸡蛋密封,并且放回潮湿的孵化器内。在孵育期之后,将胚胎从鸡蛋中切割出,并且置于冷的PBS中;使用荧光解剖显微镜将GFP-注射的细胞可视化。然后将胚胎解剖;将头部如打开的书一样切开,即,沿侧腹从鼻子向后脑依头部的长度向下切开。将解剖的胚胎固定在4%的PFA中,在室温下持续2小时或在4 $^{\circ}$ C下过夜,然后在免疫荧光染色之前用PBS洗涤两次。

**[0318] 培养的细胞制剂的免疫细胞化学法**

[0319] 在室温下用4%的PFA将腔室培养玻片固定30分钟,然后用PBS和0.1%的吐温20(Sigma-Aldrich)(PBS-T)洗涤。在室温下将培养物阻断(PBS-T中的10%马血清)30分钟并且然后与一次抗体(1:100的巢蛋白(611658;BD Biosciences,San Diego,USA);1:500的多唾液酸-神经细胞粘附分子(PSA-NCAM)(由T.Seki博士惠赠),1:500的 $\beta$ -III微管蛋白克隆,TUJ1(MMS-435P,1mg/ml;Covance,Princeton,NJ,USA);1:200的NF-M(13-0700,0.5mg/ml;Zymed,South San Francisco,CA);1:500的NF-H(AB1991;Chemicon,Temecula,CA,USA)一起在阻断溶液中在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。在相同的条件下处理小鼠、山羊以及兔(Ig)对照物。洗涤之后,在室温下在黑暗中将二次抗体(1:200山羊抗小鼠Alexa 488[A11029,



1.5mg/ml; Jackson免疫研究实验室, West Grove, PA, USA]; 1:200山羊抗兔Alexa 488 [A11034, 2mg/ml [Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA]) 加入阻断溶液中并持续2小时。最后, 将玻片洗涤并且用具有4', 6-双脒基-2-苯基吡啶二氢氯化物 (DAPI, P36931; Invitrogen) 的Prolong gold抗淬灭剂来盖住盖玻片。

#### [0320] 结果

[0321] 如图4中所示出, 当hDPSC在神经元诱导培养基中生长时, 它们分化成具有引导钠电流的生物物理特性的多进程神经元样细胞。此外, 当hDPSC移植至鸡胚胎的脑中时, 它们分化成表达神经丝的神 经元样细胞。

#### [0322] 实施例4: 在啮齿动物模型中hDPSCs治疗改善中风后前肢运动功能

[0323] 在导致缺血性中风的大脑中动脉闭塞 (MCAO) 大鼠模型中评估 hDPSCs的治疗功效。MCAO是人缺血性中风的最常见的表现, 并且 MCAO的这种临床前啮齿动物模型重现了人类条件。在这个模型中, 通过以下操作来制造MCAO: 向颈内动脉中插入尼龙丝线, 将所述 丝线向前推进以使位于颈内脉的远端的大脑中动脉闭塞。

#### [0324] 方法

##### [0325] 人DPSC培养和制备

[0326] 通过消化牙髓组织和用荧光标志物绿色荧光蛋白 (GFP) 逆转录转 导来从成人阻生 (未能完全萌出至它的预期位置) 第三磨牙分离人 DPSC。将传代3-5次的DPSC冷冻保存在含10%二甲亚砷的胎牛血清中。将细胞解冻并且在用于大脑内移植之前传代至少一次。将DPSC 在37°C下5%的CO<sub>2</sub>中, 在补充有20%胎牛血清、100DM的L-抗坏 血酸2-磷酸盐(Wako, Richmond, VA)、2mM的L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素和100μg/ml链霉素的改良的伊格尔培养基 (Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>) 中培养。用胰蛋白酶将细胞离解并 且在没有补充物的改良的伊格尔培养基中以 $1.5 \times 10^5$ 个细胞每微升 的最终浓度重悬。通过台盼蓝染料排除法测定细胞活力。

##### [0327] 啮齿动物大脑中动脉闭塞和大脑内移植

[0328] 将54只体重为 $300 \pm 20$ g的成年雄性Sprague-Dawley大鼠维持在 12-小时光/暗循环中, 随意获取食物和水。

[0329] 用异氟烷麻醉大鼠并且通过腔内近端大脑中动脉闭塞 (MCAo) 使 其经受暂时的局灶性脑缺血 [如Aspey等., *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 26:232-242, 2000和Spratt等, *J Neurosci Methods*, 155:285-290, 2006 所基本上描述的]。通过加热垫将直肠温度维持在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , 并且使用 脉搏血氧仪 (型号8500AV; Nonin Medical, Plymouth, MN) 监测血氧饱和度 和脉率且将其维持在生理参数内。简要地说, 将右颈总动脉、颈 外动脉 (ECA)、颈内动脉 (ICA) 以及翼腭动脉通过钝性分离暴露, 接着 将ECA烧灼和结扎。将4-0单丝尼龙线 (Dytek, Hendon, SA, Australia) 和硅氧烷涂覆的尖头 (直径0.35mm、长度5mm) 从ECA残干前进, 穿过ICA, 并且上行至右大脑中动脉 (MCA)。将线程固定到位, 并且 闭合切口。在闭塞2个小时后, 将大鼠再次麻醉, 且撤走线程以允许 再灌注。允许大鼠从手术中恢复, 并且在2小时时通过以尾巴使动物 短暂悬置评估对侧前肢屈曲并且评估在地板上的盘旋行为以验证 MCAo。在MCAo后24小时, 随机选取动物来接受人DPSC (n=31) 或媒介物 (n=23) 治疗 (参见描述治疗方案的图5)。将总体积为4μl的 细胞混悬液 ( $6 \times 10^5$ 个细胞) 注射 (1μL/分钟) 至两个立体定位坐标处 (相 对于前囟的前侧-后侧、内侧-外侧; 距离硬脑膜的背侧-腹侧) 的

同侧薄壁组织中。使用立体定位仪 (Kopf Instruments, Tujunga, CA) 将2 $\mu$ l 注射至纹状体 (-0.40,+4.00;-5.50mm) 并且另一个2 $\mu$ l注射至皮层 (-0.40,+4.00;-1.75mm)。类似地处理媒介物动物,施用 $\alpha$ 改良的伊 格尔培养基作为媒介物。所有动物接受每日皮下注射10mg/kg 的环 孢菌素A (Novartis, Basel, Switzerland)。

[0330] 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色

[0331] 进行2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色来证实缺血。将新鲜的脑 切为2-mm的薄片,并且在37°C下在2%的TTC (Sigma-Aldrich) 中在 黑暗中孵育10分钟。使用LiDE210平板扫描仪 (Canon, Tokyo) 将脑切 片彩色成像。

[0332] 功能评估

[0333] 在MCAo之前将动物连续训练3天,并且第三段(第-1天)被用作 术前基线。在第1天 (DPSC移植之前)、MCAo后的第7、14、21、28天(每个测试有三个试验)的光循环期间进行行为的盲法评估(图 5C)。将MCAo前神经行为训练失败(在于每个测试中动物没有达到基 线分数)的动物和在MCAo后至少1周表现出几乎没有至没有或非常 严重的功能缺陷的动物排除。实验是在随机处理分配和盲结果评估下 进行的,其符合中风治疗学术产业圆桌会议 (STAIR) 和类似的指导方 针。

[0334] 神经评分

[0335] 使用从先前研究[Barry等., Brain Res, 1389:143-151, 2011; Bederson Stroke, 17:472-476, 1986; 以及Thai等., J. Neurol. Sci, 286: 150-159, 2008]改良的评分系统评价 MCAo后每只动物的总神经功能 障碍。更高分数的指示了更严重的神经功能缺损。

[0336] 胶带去除测试

[0337] 将粘性标签(15mm<sup>2</sup>)贴在大鼠前爪的内侧面[Bouet等, Nat Protoc 4:1560-1564, 2009]。不干胶标签放置到对侧或同侧前爪的顺序 是随机化的。在返回到测试笼中时,记录每个爪子试图去除粘性标签 所花费的时间和去除标签所用的总时间(分配的最大值为2分钟)。去 除(或试图去除)胶带所花费的持续时间表达为总花费时间的百分比。

[0338] 步进测试

[0339] 使用一只手轻轻地抬起大鼠的躯干和后肢且另一只手控制一只 前爪以使体重负载在没有受限的另一只前爪上,从而牢固地抓住每只 大鼠 [Schallert等, Exp Neurol, 64: 33-43, 1979]。然后将大鼠向侧面移 动(30cm),由此负重前爪向反手方向迈步以调整身体 运动。前爪测试 的顺序是随机化的。记录每个前肢执行的步子数目。

[0340] 转棒

[0341] 将大鼠放置在由18 $\times$ 1-mm的棒[28]的电动旋转集合组成的转棒 装置上。随着旋 转速度在2分钟内从0rpm加速至24rpm,动物需要 在所述装置上行走。记录动物完成试验、 从装置上跌下、或夹住横档 以及旋转连续两个旋转而不是试图在横档上行走的时间。

[0342] 锥形/壁架平衡木行走

[0343] 动物需要横穿沿其长度变细的高平衡木且最后至一个暗盒中 [Schallert T, Woodlee MT. Orienting and placing. In: Whishaw IQ, Kolb B 编著. The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests. Oxford, U.K.: Oxford University Press 2005; 129-140], 并且将它们的表现录影。将在下悬壁架(上部平衡木表面以下2cm)上每个 后肢产生 的脚滑数目计算为横穿平衡木花费的总步子数目的百分比。由于中风 动物的盘

旋行为, MCAo后1天时不能完成平衡木行走。

#### [0344] 免疫组织化学和成像

[0345] 在神经行为评估结束时, 将大鼠深度麻醉, 直接注射1,000U的肝素至心脏中, 并且用冰冷的盐水、随后是含4% (wt/vol) 多聚甲醛的磷酸盐缓冲盐水(PBS)经心灌注。将脑去除并且在相同的固定剂中在4°C下后固定过夜。将脑包埋在石蜡中并且切成连续的5- $\mu$ m冠状切片用于比色法检测存活的人DPSC。在与小鼠抗人线粒体(1:1,500; Millipore, Billerica)、接着是生物素化的抗小鼠IgG(1:250; Vector Laboratories, Burlingame, CA)以及链霉亲和素辣根过氧化物酶缀合的抗体(1:1,000; Thermo Scientific, Rockford, IL)孵育之前, 使用含有3%正常马血清的PBS阻断切片并且在PBS中洗涤两次。在阻断溶液中稀释抗体。用3,3'-二氨基联苯胺(Sigma-Aldrich)使抗体染色视觉化。使用NanoZoomer数字病理系统(Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan)获取并分析明视场图像。在每个第二5 $\mu$ m冠状切片中计数移植后4周在啮齿动物脑(n=3)中剩余的移植细胞数目, 并且分析移植细胞的分布。

[0346] 对于双重免疫荧光研究, 在使用山羊抗-GFP(1:250; Rockland, Gilbertsville, PA)鉴定人DPSC、使用小鼠抗神经元核鉴定成熟神经元(NeuN; 1:500; Millipore)或使用兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP; 1:250; DAKO, Glostrup, Denmark)鉴定星形胶质细胞之前, 将100 $\mu$ m自由浮动的切片用含有0.3% Triton X-100含10%正常马血清的PBS阻断。所用的其它一次抗体是小鼠抗- $\beta$ -III微管蛋白(1:500; Millipore)、小鼠抗巢蛋白(1:100; Abcam, Cambridge, U.K.)、小鼠抗多唾液酸-神经细胞粘附分子(PSA-NCAM; 1:200; Millipore)以及小鼠抗-04(1:500; Sigma-Aldrich)。二次抗体是Cy2缀合抗山羊IgG、Cy3缀合抗兔IgG或Cy3缀合抗小鼠IgG(1:300; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)。在阻断溶液中稀释抗体。所有的切片用ProLong Gold抗淬灭剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)封固。为了估计共表达NeuN或GFAP的GFP阳性细胞的百分比, 在5个场(由在DPSC移植水平下同侧半球中的2个皮层和3个纹状体区域组成)中以D40的放大率拍摄z-堆叠图像(n=3只动物)。使用TCS SP5共聚焦显微镜顺次获取共聚焦图像并且使用它的LAS AF软件(Leica Microsystems, Wetzlar)进行处理。使用ImageJ(NIH)进行正交投影。

#### [0347] 胼胝体厚度测量

[0348] 使用0.1%的甲酚紫将在前囟和前囟 $\pm$ 0.1mm的水平下的石蜡切片染色(n=6DPSC-处理的, n=2媒介物-处理的)。在脑的两个半球的脑室的中线(在两个半球之间的中点)和侧缘进行胼胝体厚度测量。测量值表达为相应的中线测量值的百分比并且使用Axio Vision成像软件(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)来完成。

#### [0349] 统计分析

[0350] 使用GenStat(第13版; VSN International, Hemel Hempstead, U.K.)进行分析。使用重复测量的方差分析(ANOVA)来分析治疗对行为测试评分的影响, 使用Greenhouse-Geisser校正来说明单个大鼠的连续测量值之间的关联, 并且调整中风前数据作为协变量以允许大鼠初始能力中可能的差异。如果初始ANOVA是显著的, 则进行事后费雪保护的最小显著差异(LSD)检验。在 $p < 0.05$ 下, 差异被认为具有统计学显著性。使用R(版本2.10.1; R Development Core Team, Vienna, Austria)将数据呈现为箱线图或使用Prism(版本

5.02, GraphPad Software, Inc., San Diego) 使其呈现为条形图。报告值是平均值 $\pm$ SEM。

[0351] 结果

[0352] 移植的人DPSC增强了中风后前肢感觉运动恢复

[0353] 探讨了人DPSC治疗在局灶性脑缺血后改善随着时间推移的神经行为功能的能力。关于发病率或死亡率,与对照相比,没有观察到DPSC治疗后的有害影响。大脑内移植后获得的死亡率在两个治疗组中是相当的(大约9%)。

[0354] 单侧MCAo的临床相关啮齿动物模型引起对啮齿动物脑同侧半球的背外侧纹状体和上覆的额/顶叶皮层的实质性缺血性损伤。因此,通过在中风后第1天 $11.7\pm 0.4$ 分的神经评分增加来证明动物已发展了神经行为缺陷(图6A)。此外,标记的前肢躯体感觉和运动不对称在步进测试(图6B,在MCAo后第1天对侧前肢收集的步数数目的降低为 $82.2\pm 6.6\%$ ),以及胶带去除测试(图6C;在MCAo后第1天试图从对侧前爪去除外部刺激的时间减少为 $93.7\pm 2.8\%$ )中展示。

[0355] 在实验性中风中,在转棒测试(图6D;MCAo后第1天花费在转棒上的时间减少为 $53.0\pm 2.0\%$ )中也观察到运动平衡和协调的丧失。

[0356] 受中风影响的动物表现出MCAo后第1周时平衡木行走期间对侧后肢的脚滑中的后肢不对称(图6E;增加为 $21.7\pm 6.2\%$ )。同侧肢体具有正常的中风后神经行为功能。

[0357] 所有动物在中风后4周中展现出逐步恢复的神经行为功能(图6)。与媒介物治疗组相比,DPSC治疗的动物表现出明显提高的总体神经行为功能(图6A; $p<0.018$ 组 $\times$ 天相互作用,重复测量的ANOVA)和显著下降的神经评分,特别是中风后第21天( $p<0.05$ ,事后费雪保护的LSD)和第28天( $p0.01$ )。在肢体特定的神经行为研究中,在步进测试(图6B; $p<0.045$ 总体组效果)和胶带去除测试(图2C; $p<0.049$ 总体组效果)中,与媒介物对照相比,DPSC治疗的动物表现出明显增加的同侧(受中风影响)前肢感觉运动恢复。总体来说,DPSC治疗的动物在所有测量的天数中使用对侧前肢时显示出降低的中风后缺陷。

[0358] 在治疗组之间在同侧肢体功能上无显著差异。在治疗组之间在转棒中(图6D)和锥形/壁架平衡木行走(图6E)测试中的表现没有统计学显著差异( $p<0.05$ )。肢体之间增加的功能改善的差异的一种可能解释是:由于对这个区域的优先血管供应,这种啮齿动物MCAo模型对啮齿动物脑中代表前肢功能的感觉运动皮层产生了更大的破坏[Salo等, Soc Neurosc Abstr 13:1268, 1987]。为了支持这点,如通过步进和胶带去除测试所测量在本研究的动物中存在严重的前肢功能丧失,但如在MCAo后立即通过锥形/壁架平衡木行走测试所评价后肢功能的损害不那么明显。转棒跑和平衡木行走分别评估运动协调和后肢功能[Hicks等, Cell stem Cell, 5:139-140, 2009],并且这些测试可能对检测中风后缺陷的敏感性不足。与媒介物治疗的动物相比,DPSC治疗后增加的功能改善在4周的前肢分析中变得明显而后肢功能则不是。

[0359] 另一个解释可能涉及到动物的学习到的代偿运动行为。在转棒跑和锥形/壁架平衡木行走测试中,通过重复的测试,啮齿动物可能已学会以下新颖的方式:可以使用未受中风影响的肢体或尾偏斜来补偿受中风影响的肢体的功能丧失[Schaar等, Exp Transl Stroke Med, 2:13, 2010]。如通过步进和胶带去除测试所测量,前肢-特定的任务允许最少使用补偿行为来克服中风后感觉运动功能的丧失。

[0360] 前述的数据指示了hDPSC移植影响了中风后宿主神经系统的正常功能并且与对

照动物相比产生了改善的神经功能。不受理论或作用模式约束,这种改善可能在中风后的脑内通过神经可塑性改变产生。例如,如上所示,STRO-1<sup>+</sup>细胞表达SDF-1 (CXCL-12)。hDPSC也显示出表达这种趋化因子。此外,来自移植至鸡胚头部后的宿主三叉神经节的hDPSC趋化轴突使这些动物表现出在稍后的时间点的显著的功能改善。

[0361] 移植后4周时缺血性脑中DPSC的存活

[0362] DPSC移植后的神经行为研究中的发现指示了在神经评分和前肢感觉运动功能中位于稍后的时间点的峰值效益。随后的研究探讨了解释这些发现的底层细胞机制是否是由于DPSC在中风脑内的移植后的神经细胞替代。例如,测定当观察到峰值效益时在研究终点时存活的捐献者细胞的数目。使用不与大鼠组织发生交叉反应的对抗人线粒体抗原的特异性抗体来可视化啮齿动物脑内的单个DPSC。在每个第二脑冠状切片中,即在10- $\mu$ m的间隔下,手动计数标记的细胞的数目。在移植后4周时每个动物的脑中检测到的人线粒体阳性细胞的总数目的范围在9,458至22,394个细胞之间(表5)。这给出了13,807-4,293个剩余的人DPSC的平均数目以及最初移植的 $6 \times 10^5$ 个细胞的 $2.3 \pm 0.7\%$ 的平均存活率。我们的数据证明了细胞移植是成功的并且产生了缺血后脑中源自DPSC的细胞的长期生存能力,尽管数量很少。

[0363] 不受理论或作用模式约束,由于只有平均2.3%的初始移植的hDPSC存活到中风后28天,所以神经元替代不大可能是hDPSC改善神经功能的主要作用机制。然而,所述神经元替代可以提供一些治疗益处。可能造成这种改善的替代或额外的机制包括神经保护作用、血管生成、免疫调节和神经可塑性。

[0364] 表5:4周时所移植的人DPSC的存活

	大鼠 1	大鼠 2	大鼠 3	平均值 $\pm$ SEM
存活的人 DPSC 数目	9,458	9,570	22,394	13,807 $\pm$ 4,293
DPSC 存活率(%)	1.6	1.6	3.7	2.3 $\pm$ 0.7

[0365] 在大脑中动脉闭塞后4周时存活的人DPSC的总数目和百分比(表示为最初移植的600,000个细胞的百分比)。将一系列5- $\mu$ m大鼠脑冠状切片针对人线粒体抗原进行染色以显示人DPSC并且计数人线粒体抗原阳性细胞。

缩写: DPSC, 牙髓干细胞。

[0366] DPSC向中风损害的靶标迁移

[0367] 还分析了移植至缺血性大鼠脑之后的人DPSC的空间分布。在移植后24小时,发现DPSC聚集在注射部位周围。4周后,发现人线粒体标记的细胞主要在环绕梗塞核心周围的区域内(图7、图8A、图8B),表明移植的细胞从移植部位优先地向缺血梗塞迁移并且定位在缺血边界区(IBZ)。在细胞移植部位对侧的半球内(图7、图8A、图8B)和胼胝体中(图8B)观察到少量DPSC。在4周期间,细胞已迁移至对侧半球内至少4mm。与健侧半球相比,源于DPSC的细胞广泛地以低数目分布在对侧半球中,并且DPSC无明显迁移至对侧半球的特定靶标区域中。在极少情况下,源于DPSC的细胞并入且围绕具有与内皮细胞(图4C,箭状物)、周皮细胞或平滑肌细胞(图4C,箭头)一致的形态外观的大脑微血管壁。

[0368] 移植的人DPSC在体内分化成神经元和星形胶质细胞

[0369] 然后检查缺血后4周的脑中人线粒体抗原阳性细胞的形态。表现出具有与星形胶

质细胞一致形态的细胞显示了恒星样外观(图8D,箭状物),而假定的神经元细胞表现出长突起(图8D,箭头)。为了验证这些表型,使用了双重免疫荧光分析和共聚焦成像。移植的人DPSC之前已被逆转录转导来表达GFP,这允许用NeuN或GFAP共标记来分别鉴定成熟神经元或星形胶质细胞。GFAP与胶质瘢痕内的细胞中GFP表达共区域化确证了源于DPSC的细胞已分化成星形胶质细胞。在同侧梗塞周围皮层区域内,NeuN和GFP双阳性细胞指示了移植的DPSC分化成神经元。星形胶质细胞和神经元在缺血后同侧大脑半球中的分布不均匀。在纹状体区域中的IBZ处,源于DPSC的星形胶质细胞占主要( $51.0 \pm 8.6\%$ GFAP/GFPD双阳性细胞,表达为GFP单标记细胞的百分比),而相比之下,源于DPSC的神经元占更小的比例( $8.7 \pm 6.1\%$ NeuN/GFPD细胞)。在梗塞周围的皮层区域内,星形胶质细胞和神经元的比例似乎类似(分别是 $38 \pm 0.6\%$ GFAP/GFP细胞和 $32.1 \pm 1.8\%$ NeuN/GFPD细胞)。发现移植的DPSC沿纹状体中的IBZ主要地分化成星形胶质细胞,其似乎并入胶质瘢痕内。与纹状体相比,在皮层梗塞周围区域内有更多的源于DPSC的神经元存在。令人感兴趣的是,在梗塞周围皮层区域内大约1/3的GFP细胞也用早期/中间神经元标志物 $\beta$ -III微管蛋白标记。然而,在沿着IBZ的胶质瘢痕内,许多GFP细胞还共表达神经祖细胞标志物巢蛋白。皮层中巢蛋白/GFPD细胞的证据几乎没有。在梗塞周围皮层中,一些GFP细胞还对迁移的成神经细胞标志物PSA-NCAM呈阳性。在极少情况下,在移植后4周时在啮齿动物脑中观察到源于DPSC的少突胶质细胞(04/GFPD细胞)。

[0370] DPSC治疗减少中风后胼胝体萎缩

[0371] 还探讨了DPSC治疗对中风损害后穿过胼胝体的两半球间的连通性的丧失的影响。在中风后4周,与媒介物治疗组相比,DPSC治疗的动物中同侧胼胝体萎缩有不明显的减少(DPSC治疗的, $67.6 \pm 12.5\%$ ,L2测量值表达为相应的中线L1测量值的百分比;媒介物治疗的, $56.6 \pm 3.0\%$ ;  $p > .05$ ) (图9)。在DPSC治疗的脑中,同侧半球中的胼胝体的厚度示出了朝向更好的保护的趋势并且在对侧(未受中风影响的)半球取得类似的胼胝体厚度。在治疗组之间对侧半球中的胼胝体厚度没有差异(DPSC治疗的, $66.1 \pm 14.0\%$ ;媒介物治疗的, $66.5 \pm 1.6\%$ )。

[0372] 实施例5:食蟹猕猴STRO-3<sup>+</sup> MPC的表征

[0373] 将猿猴骨髓祖细胞(来自食蟹猕猴;cyno-MPC)从自雌性食蟹猕猴(*macaca fascicularis*)收集的约15ml的骨髓抽吸液中分离。使用聚蔗糖梯度(Ficoll gradient)将骨髓抽吸物悬浮液分离并且洗涤以移除无核细胞(红血球)。将有核细胞计数然后通过连接CA12抗体(抗STRO-3)和Dyna1beads进行分离。将连接有抗体和珠粒的细胞通过MPC-1磁体的磁场进行阳性选择。将阳性选择的细胞计数,并且接种至T形瓶中的生长培养基中作为传代(p.)0。在集落形成测定(CFU-F)中使用预选、阳性和阴性细胞。

[0374] 使用生长培养基喂养cyno-MPC细胞。每2至4天喂养所有培养物(p.0-p.5)直到它们达到所需的汇合度。接着使用HBSS洗涤,以及随后相继使用胶原酶和胰蛋白酶/Versene)来对细胞进行传代或收获细胞。将p.1细胞计数并且接种至T形瓶中。当p.1cyno-MPC细胞达到所需汇合度时,收获细胞并且使用速率受控的冷冻机进行低温保存。

[0375] 将传代1低温保存cyno-MPC解冻并且接种至T形瓶中(p.2)。将p.2细胞在细胞工厂中传代至p.3。收获p.3细胞并在细胞工厂内传代至p.4。将额外的p.3细胞低温保存。将

p.4细胞在6×细胞工厂传代 至p.5。当p.5cyno-MPC细胞达到所需的汇合度时,收获细胞并且使用速率受控的冷冻机低温保存。将细胞在50%的 $\alpha$ MEM、42.5%的 Profreeze,以及7.5%的DMSO中低温保存。样品是针对CFU-F测定、FACS、无菌性、支原体以及内毒素进行测试。

[0376] 培养的cyno-MPC的免疫表型的代表性流式细胞仪分析结果在图 10中示出。如所示出的,这些细胞是STRO-1<sup>+</sup>、STRO-4<sup>+</sup>以及CD146<sup>+</sup>。

[0377] 实施例6非人灵长类动物 (nhp) DPSC的预期分离:

[0378] 使用磁珠分选允许从纤维状牙髓组织纯化出稀少的DPSC。收获 牙髓组织并且酶消化之后,可以从一个成人的第三磨牙回收大约 $1-2 \times 10^5$ 个细胞。鉴于此,从同一动物收集来源于多颗牙齿的汇集的细胞。将非人灵长类牙髓的单细胞悬浮液与我们先前示出的与非人灵长类骨髓细胞反应的针对人MPC相关性抗原的抗体一起孵育(图10), 包括STRO-1(小鼠IgM抗人MPC;Developmental Studies Hybridoma Bank,University of Iowa,Iowa City,IA,USA);CD146(小鼠IgG2a抗人CD146/MUC-18;9);或STRO-4(小鼠IgG1抗人热休克蛋白- $\beta$ )。将 标记的牙髓细胞与绵羊抗小鼠IgG缀合的或大鼠抗小鼠IgM缀合的 磁珠Dynabead(每个细胞4个珠:Dynal,Oslo,Norway)一起孵育。根据 制造商建议的方案,使用MPC-1磁性颗粒集中器(Dynal)来收集磁珠 阳性细胞。将STRO-1、STRO-4或CD146磁珠阳性细胞以约 $3 \times 10^4$ 个细胞/cm<sup>2</sup>接种于生长培养基中以在标准生长培养基(补充有20% (v/v) FBS、2mM L-谷氨酰胺、100mM L-抗坏血酸-2-磷酸盐、50U/ml 青霉素、50mg/ml链霉素的 $\alpha$ -MEM)中产生初级培养物。在达到约 90%汇合后,将初级DPSC以约 $0.5-1 \times 10^4$ 个细胞/cm<sup>2</sup>的接种密度进行传代培养。

[0379] 实施例7 nhpDPSC集落频率的评定:使用集落形成性成纤维细胞测定

[0380] 评定STRO-1、STRO-4或CD146抗体作为单一试剂纯化 nhpDPSC的效率。一式三份,将未分级分离的以及STRO-1、STRO-4 或CD146阳性和阴性选择的细胞部分以0.3、1.0以及 $3.0 \times 10^4$ 个细胞/孔接种至6孔培养板中的标准生长培养基中,并且在37°C、5%CO<sub>2</sub> 以及>90%的湿度下孵育12天。将大于 $\geq 50$ 个细胞的聚集体评为成纤维细胞性集落形成单位(CFU-F)。使用引起最高CFU-F群落形成发生率的抗体选择方案来产生GLP级nhpDPSC以用于功能表征研究。

[0381] 实施例8 nhpDPSC的表征

[0382] 流式细胞分析是用来表征离体扩增的DPSC的免疫表型。如前所 描述对处于不同细胞代数的间充质和非间充质干细胞相关表面标志 物的表达进行评定。当使用异体nhpDPSC来治疗缺血性中风时,评 定了这些细胞抑制在混合淋巴细胞反应中或与有丝分裂原刺激的淋 巴细胞在体外共培养时活化的免疫细胞的免疫调节能力(例如,如 Wada等,J cell Physiol,219:667-676,2009中描述的)。

[0383] DPSC产生中胚层和外胚层组织(包括类似于由其得到的那些)的 能力是这些细胞的一个标志性特征。通过在诱导条件下培养来探讨 DPSC在体外分化成不同细胞谱系的能力。使用离体扩增的nhpDPSC 来评定多谱系分化成为成骨细胞(矿藏的茜素红染色)、脂肪 细胞(脂滴 的油红O染色)以及软骨细胞(硫酸蛋白多糖和II型胶原表达的甲苯胺 蓝染色)的能力,例如,如Grontos等,J Cell Sci.,116:1827-2835,2003 中所描述。

[0384] 将离体扩增的预先标记了GFP的nhpDPSC单细胞悬浮液与作为 载体媒介物的陶瓷

羟基磷灰石/磷酸三钙 (HA/TCP) 颗粒组合额外地皮下移植至严重受损免疫缺陷 (NOD/SCID) 小鼠 (n=3) 的背侧面中, 保持一段约8周的时期。在移植后8周之后, 将受体动物处死以取回移植 物用于组织学分析。

[0385] 有关nhpDPSC体外分化成神经细胞的评定是在如前描述的神经 诱导培养条件下在用多鸟氨酸涂布的腔室培养玻片上进行。

[0386] 使用实时PCR和免疫组织化学来评定早期 (NeuroD、巢蛋白、NeuN、b-III微管蛋白) 和晚期 (GFAP、神经丝中链和重链) 的基因和蛋 白质表达。

[0387] 执行膜片钳技术来确定分化的nhpDPSC在体外发起动作电位的 能力。

[0388] 此外, 通过将GFP标记的nhpDPSC胚蛋注射至鸡胚中 (例如, 如前描述的) 来确定这些细胞的神经原性和神经可塑性电位。

[0389] 通过在植入后第7天和第14天测量电压依赖性钠和钾通道在300  $\mu$ m脑组织切片上的存在来评定所植入的GFP标记的DPSC的电生理 特性。

[0390] 这些研究共同地定义了用于在非人灵长类动物临床前研究中治 疗中风的异体nhpDPSC群。

[0391] 实施例9: 使用nhpDPSC来改善非人灵长类动物缺血性中风模型的运动功能

[0392] 人与非人灵长类动物之间在复杂的认知能力、显著的社会复杂性 以及大脑组织的精细复杂性方面的相似之处使其成为了研究神经系 统疾病和障碍的很好的模型。

[0393] 使用经由颈内动脉的尼龙丝线阻塞通过MCAO方法来产生非人 灵长类动物缺血性中风模型 (例如, 如Freret等, J Cereb Blood Flow Metab., 28:786-796, 2008中描述的)。以食蟹猴 (一种旧大陆猴类 (食蟹 猕猴)) 产生非人灵长类动物模型。以下是有关缺血性中风研究的实验 设计程序:

[0394] (i) 在中风前对所有动物进行基线神经行为测试。

[0395] (ii) 诱导MCAO缺血性中风模型。

[0396] 简要地说, 对猴子进行麻醉、气管插管并且机械通气, 同时集中 监测血氧水平、中心体温、血压、ECG以及颅内血流量的激光多普 勒血流测定。详细的手术是由经验丰富的神经科学家暴露在颈外和颈 内动脉分叉处的右颈总动脉来执行。对颈外动脉和其它分支动脉进行 烧灼以确保丝线沿着颈内动脉顺利通过, 到达大脑中动脉的起端。将 0.54mm直径  $\times$  3mm长度的经过硅橡胶涂覆的尼龙丝线插入至颈内 动脉中并且前进直到感觉到阻力, 此指示丝线已经使大脑中动脉闭 塞。通过结扎线将丝线固定到位。MCAO后3小时, 将硅橡胶涂覆 的尼龙丝线撤走以引起再灌注, 这一过程近似于人的大脑中动脉缺血 性中风。

[0397] (iii) 在MCAO后第7天进行MRI以确定是否引起了合适大小 和位置的缺血性中风。

[0398] (iv) 细胞疗法设计包括在中风后一周对三个组进行 $5 \times 10^5$ 或  $1.5 \times 10^6$ 个nhpDPSC 或者单独培养基 (无细胞) 的纹状体内注射。如在 啮齿动物中一样, 由于颅内压升高导致发病, 故可以安全地注射至中 风后的大脑中的流体的体积是有限的。这在猕猴中估计为12 $\mu$  L。因 此, 所有纹状体内注射将是12 $\mu$ L, 其中细胞浓度不同。如前述将猴 子麻醉, 并且在头骨上制造一个钻孔以进行立体定向纹状体内注射。

[0399] (iv) 在为期6周的研究期间, 每周一次进行神经行为测试。为 了充分探讨MCA缺血性中风之后感觉-运动缺陷的程度, 使用了以下 测试: 猴 CANTAB® (剑桥自动化成套神经心理测试 (CAMbridge Neurophysiological Test Automated Battery))、神经评分、山



和谷爬梯 (Hill-and-Valley Staircase) 以及触觉前肢刺激 (Tactile forelimb stimulation) 测试 (例如, 如Bihel等, J Cereb Blood Flow Metab., 30: 273-285, 2010中描述的)。

[0400] (vi) 研究在中风之后第6周完成。

[0401] 实施例10: 植入的nhpDPSC与NHP脑组织之间的相互作用

[0402] 10.1缺血半暗带的救治:

[0403] 在缺血性中风的周围有一个处于死亡风险但可以被救治的缺血 半暗带组织区域。STRO-1<sup>+</sup>细胞疗法可以与这个缺血半暗带相互作用 并且因此限制中风的大小。

[0404] 将猴子麻醉并且俯卧定位于.0T的Siemens Trio扫描仪上, 并且 以一定视场(180×180mm) 和平面分辨率为0.5×0.5的图像采集矩阵 来采集T2-W涡轮自旋回波图像 (T2WI, TR/TE=4800/86ms)。采集十 二张间隔0.2mm的切片厚度为2mm的T2WI冠状图像。将使用 Siemens MRI软件对每只猴子在T2WI上的梗塞体积进行描绘。

[0405] 10.2NHP中风脑中的神经元取代和连接性

[0406] 梗塞导致一个大脑半球约2/3的神经元和神经胶质缺失。这一系 列探讨的目标在于确定: (1) 存活的nhpDPSC的数目、(2) 分化成神 经元或神经胶质的nhpDPSC的数目、以及 (3) nhpDPSC来源的神 经元是否产生功能连接。为了做到这一点, 用逆转录病毒转导 nhpDPSC 以使其表达GFP并且在移植之前在BrdU (大约20μM, 保持24小时) 中培养以用于核 标记。这两种标记方法提供了对于宿主脑内植入的 nhpDPSC的正式鉴别。

[0407] 通过确定规定体积中nhpDPSC的密度以体视学估计分化成神经 表型的nhpDPSC的 数目。从啮齿动物研究中我们发现了在4周时, hDPSC迁移至中风部位中在前-后方向上距 注射部位大约1mm处 (这 从脑表面上的伤痕来看是显而易见的)。因此, 前-后轴线到注射部 位的厚度为8mm的猴脑包括了到中风后6周时大部分的移植的人细 胞。沿这个轴取得 100mm的连续冠状切片 (在100mm下约4×10<sup>3</sup> mm组织宽度=每只治疗动物40个冠状切片)。 构建随机抽样方案 (使 用Image J) 来对标准化组织体积中BrdU阳性细胞的数目进行计数。 使用Bio-Rad MRC-1000UV共聚焦显微镜 (Adelaide Microscopy) 来进 行阳性染色的人细 胞的直接3维计数。共聚焦显微术鉴别出与分化的 细胞 (例如使用针对神经丝中链 (NF-M) 或β-III微管蛋白的抗体的神经 元、表达胶质纤维酸性蛋白GFAP或酪氨酸羟化酶的星形胶 质细胞) 所表达的胞浆抗原共定位的GFP阳性或BrdU阳性nhpDPSC。

[0408] 还评定了植入至猴子中风中的获自nhpDPSC的神经元的电生理 学特性。首先, 评定从啮齿动物中风脑中分离的单个获自nhpDPSC 的神经元的生物物理学特性。简要地说, 将动物断头并且取出脑, 并 放置于冰冷的含氧盐水中。使用振动组织切片机将脑切为300- 500 mm厚度的切片, 洗涤并且然后通过胰蛋白酶和胶原酶的混合物进行 酶消化。通过小心 地抽吸组织来获得单个神经元, 洗涤并且接种于胶 原处理过的玻璃盖玻片上。24小时的恢 复之后, 将细胞用于全细胞 膜片钳技术。获自nhpDPSC的神经元被鉴别为GFP阳性细胞。使 用 适当电压方案和通道抑制剂来鉴别这些细胞所表达的电压门控通道 的类型。

[0409] 通过脑切片中细胞的膜片钳技术和成像来探讨获自nhpDPSC的 神经元产生动作 电位 (AP) 和与其它神经元形成连接的能力。在振动切 片机上将靠近注射部位的脑切为 250-400mm厚度的切片。在室温和 恒定充氧下恢复1小时的时间之后, 将单个切片转移至安 装在直立的 具有荧光附件IR和DIC光学的BX51WI Olympus显微镜上的记录室 中。首先使

用GFP荧光鉴别nhpDPSC,并且然后使用IR滤光器(720-850nm)和Rolera-XR IR感光摄影机(Rolera-XR IR-sensitive camera)来进行观测。使用EPC-10计算机控制的放大器和相关仪器来进行脑切片中神经元的全细胞膜片钳技术。通过注射去极化电流来引起Ap并且以电流钳模式记录。

[0410] 为了探讨由nhpDPSC产生的AP是否能通过紧密连接或突触连接传播至周围神经元,使用Fura-2荧光联合膜片钳技术来观测胞内 $Ca^{2+}$ 浓度的改变。简要地说,向脑切片装载可渗透膜的Fura-2AM,洗涤并且置于记录室中。通过GFP荧光来鉴别所植入的获自nhpDPSC神经元并使用IR进行膜片钳技术。然后将荧光设置改变成适合Fura-2测量的那些。通过传递去极化电流来引起nhpDPSC中的Ap并且在周围啮齿动物宿主神经元中测量荧光。

[0411] 10.3非人灵长类动物中风脑的功能MRI (fMRI) 和弥散张量成像 (DTI) 以便探讨神经可塑性:

[0412] 这些技术允许进行如与对照猴子相比在nhpDPSC治疗之后的神经可塑性的无创探讨。在缺血性中风模型中,使用了fJVIRI来评定前肢运动控制并且确定在nhpDPSC治疗之后运动皮层是否有更强的活化。fJVIRI研究是在治疗之后3周和6周进行的。

## 序列表

- <110> 麦瑟布莱斯特公司  
中央阿德莱德当地卫生网络公司
- <120> 治疗中风的影响的方法
- <130> 512140
- <150> 61/493057
- <151> 2011-06-03
- <160> 36
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <220>
- <221>
- <222>
- <223> 用于扩增GAPDH的寡核苷酸
- <400> 1
- cactgacacg ttggcagtgg 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <220>
- <221>
- <222>
- <223> 用于扩增GAPDH的寡核苷酸
- <400> 2
- catggagaag gctggggctc 20
- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <220>
- <221>
- <222>
- <223> 用于扩增SDF-1的寡核苷酸
- <400> 3

gagacccgcg ctcgtccgcc 20  
<210> 4  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增SDF-1的寡核苷酸  
<400> 4  
gctggactcc tactgtaagg g 21  
<210> 5  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增IL-1 $\beta$ 的寡核苷酸  
<400> 5  
aggaagatgc tggttccctc tc 22  
<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增IL-1 $\beta$ 的寡核苷酸  
<400> 6  
cagttcagtg atcgtacagg tgc 23  
<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增FLT-1的寡核苷酸

<400> 7  
tcactatgga agatctgatt tcttacagt 29  
<210> 8  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增FLT-1的寡核苷酸  
<400> 8  
ggtataaata cacatgtgct tctag 25  
<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增TNF $\alpha$ 的寡核苷酸  
<400> 9  
tcagatcatc ttctgaacc 20  
<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增TNF $\alpha$ 的寡核苷酸  
<400> 10  
cagatagatg ggctcatacc 20  
<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>

<223> 用于扩增KDR的寡核苷酸  
<400> 11  
tatagatggt gtaacccgga 20  
<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增KDR的寡核苷酸  
<400> 12  
tttgtcactg agacagcttg g 21  
<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增RANK-配体的寡核苷酸  
<400> 13  
aacaggcctt tcaaggagct g 21  
<210> 14  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增RANK-配体的寡核苷酸  
<400> 14  
taaggagggg ttggagacct cg 22  
<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>

<222>  
<223> 用于扩增瘦蛋白的寡核苷酸  
<400> 15  
atgcattggg aaccctgtgc 20  
<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增瘦蛋白的寡核苷酸  
<400> 16  
gcaccaggg ctgaggtcca 20  
<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增CBFA-1的寡核苷酸  
<400> 17  
gtggacgagg caagagtttc a 21  
<210> 18  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增CBFA-1的寡核苷酸  
<400> 18  
tggcaggtag gtgtgtagt g 21  
<210> 19  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>

<221>  
<222>  
<223> 用于扩增PPAR $\gamma$  2的寡核苷酸  
<400> 19  
aactgcgggg aaacttggga gattctcc 28  
<210> 20  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增PPAR $\gamma$  2的寡核苷酸  
<400> 20  
aataataagg tggagatgca ggctcc 26  
<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增OCN的寡核苷酸  
<400> 21  
atgagagccc tcacactcct c 21  
<210> 22  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增OCN的寡核苷酸  
<400> 22  
cgtagaagcg ccgataggc 19  
<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)



<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增MyoD的寡核苷酸  
<400> 23  
aagcgccatc tcttgaggta 20  
<210> 24  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增MyoD的寡核苷酸  
<400> 24  
gcgagaaacg tgaacctagc 20  
<210> 25  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增SMMHC的寡核苷酸  
<400> 25  
ctgggcaacg tagtaaaacc 20  
<210> 26  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增SMMHC的寡核苷酸  
<400> 26  
tatagctcat tgcagcctcg 20  
<210> 27  
<211> 21  
<212> DNA

- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增GFAP的寡核苷酸  
<400> 27  
ctggtgccag agatggaggt t 21  
<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增GFAP的寡核苷酸  
<400> 28  
tcatcgctca ggagtcctt 20  
<210> 29  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增巢蛋白的寡核苷酸  
<400> 29  
ggcagcgttg gaacagaggt tgga 24  
<210> 30  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增巢蛋白的寡核苷酸  
<400> 30  
ctctaaactg gagggtcag ggct 24  
<210> 31  
<211> 21

<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增SOX9的寡核苷酸  
<400> 31  
ctctgcctgt ttggactttg t 21  
<210> 32  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增SOX9的寡核苷酸  
<400> 32  
cctttgcttg ccttttacct c 21  
<210> 33  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增X型胶原的寡核苷酸  
<400> 33  
agccagggtt gccaggacca 20  
<210> 34  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增X型胶原的寡核苷酸  
<400> 34  
ttttcccact ccaggagggc 20  
<210> 35

<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增聚集蛋白聚糖的寡核苷酸  
<400> 35  
cactgttacc gccacttccc 20  
<210> 36  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> 用于扩增聚集蛋白聚糖的寡核苷酸  
<400> 36  
accagcggaa gtccccttcg 20

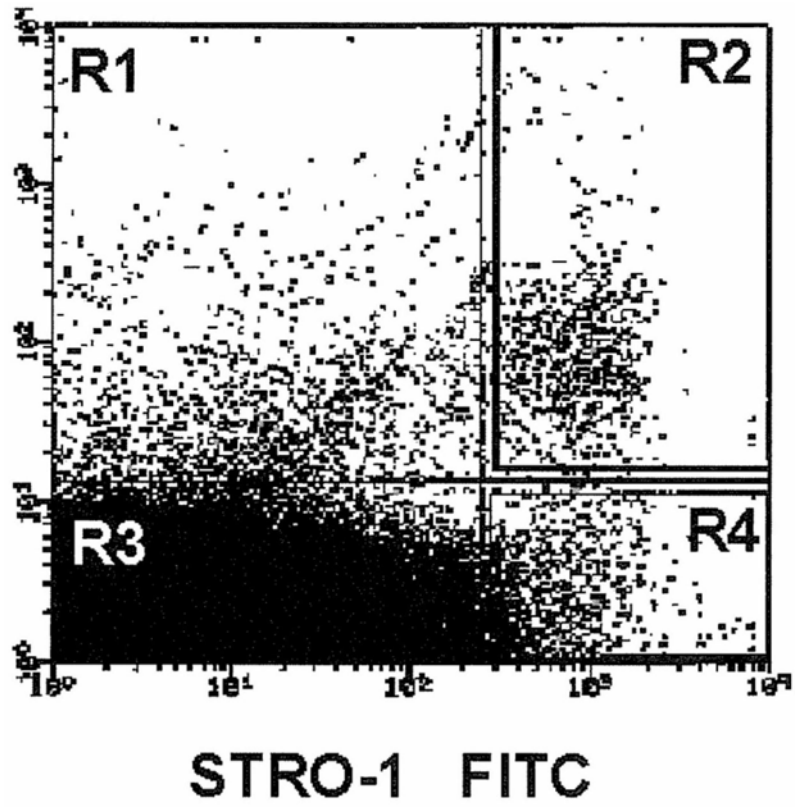


图1

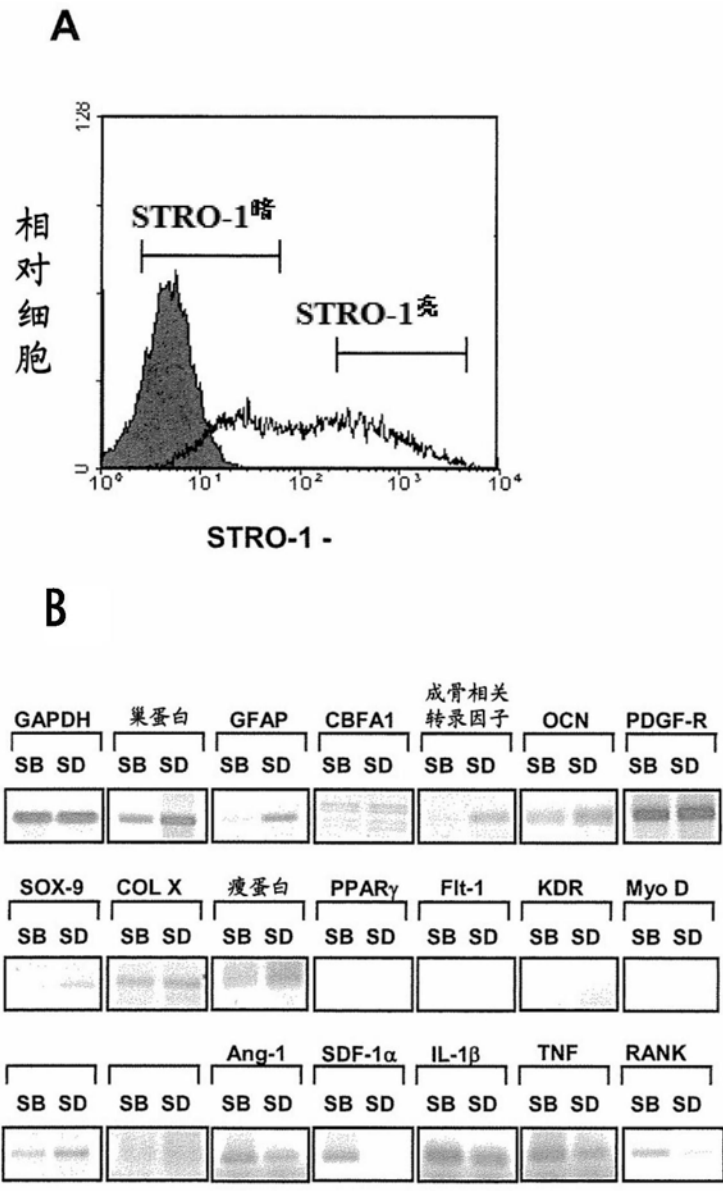


图2

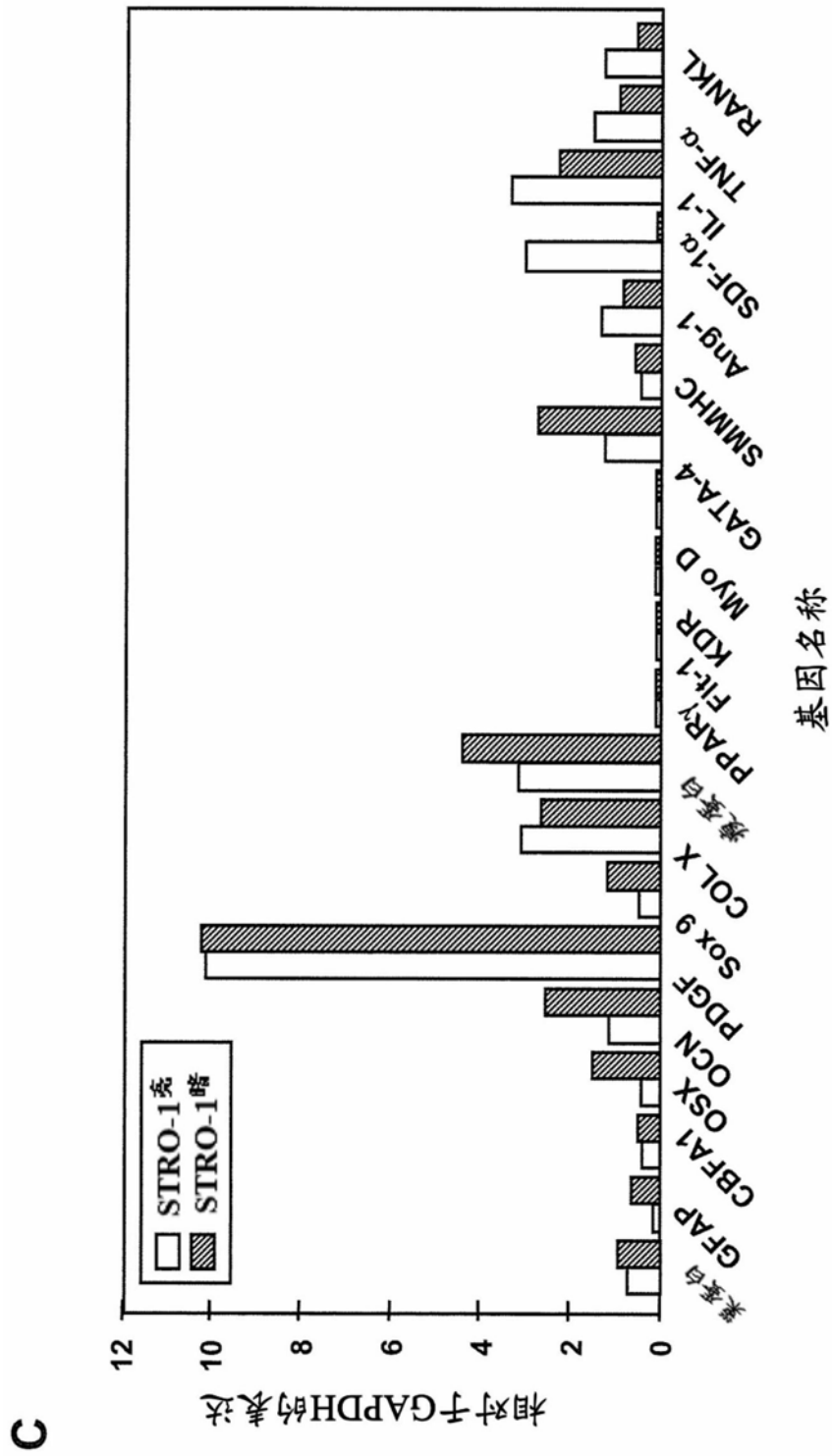


图2(续)

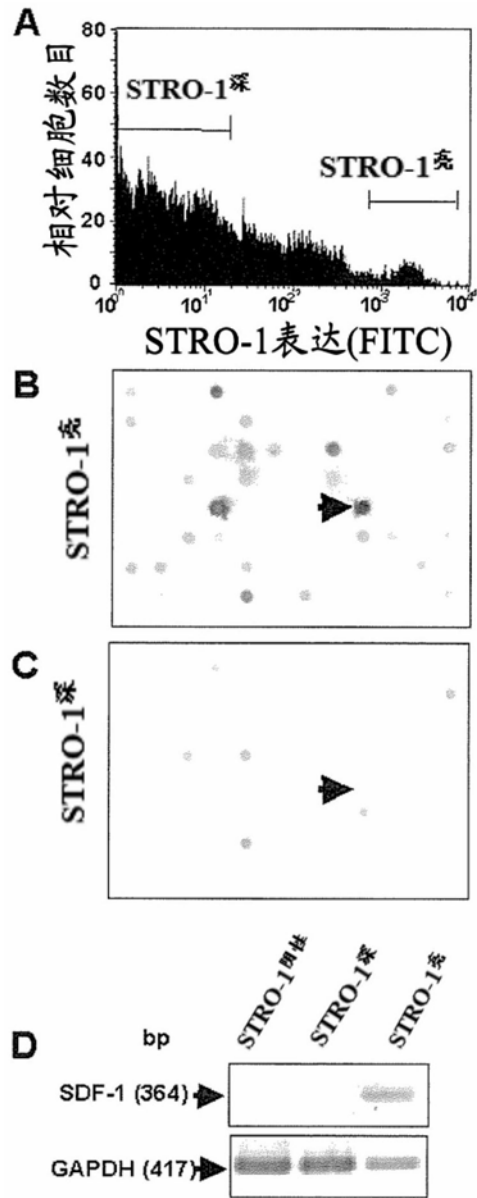


图3



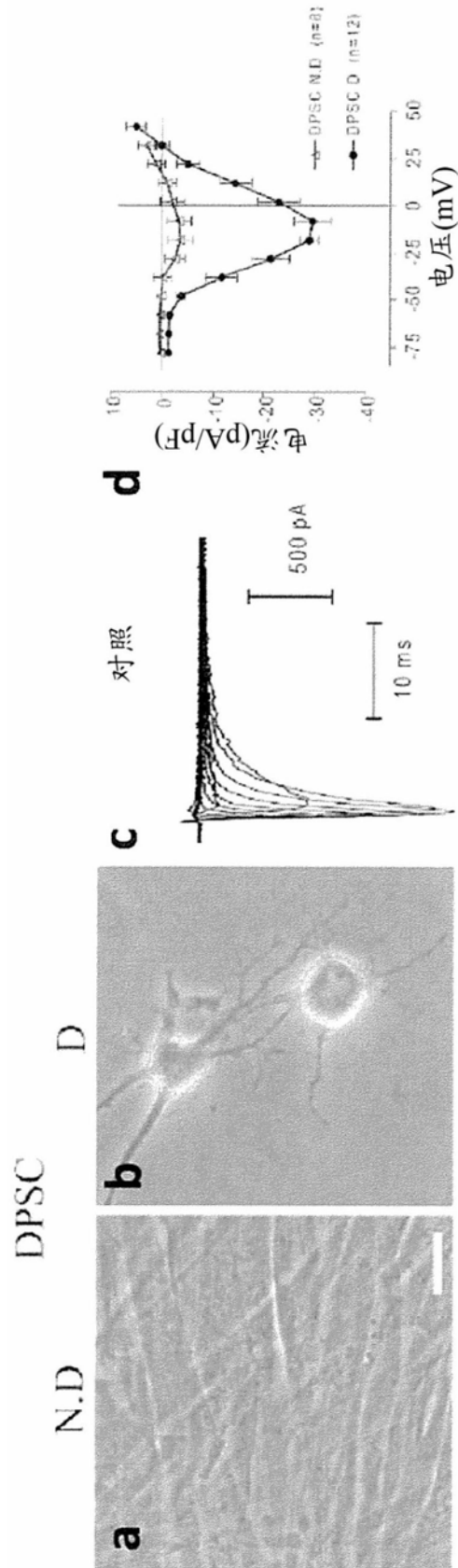


图4

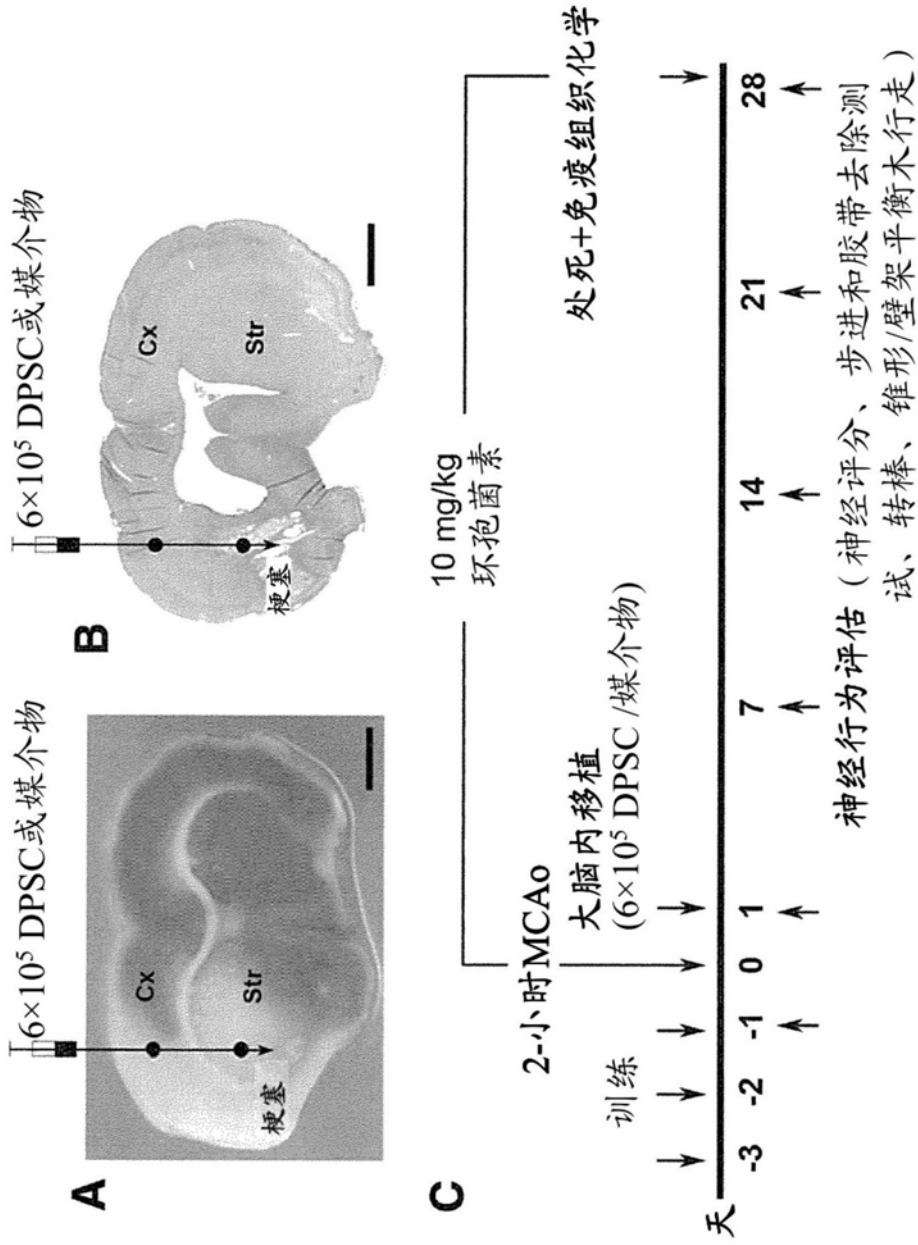


图5

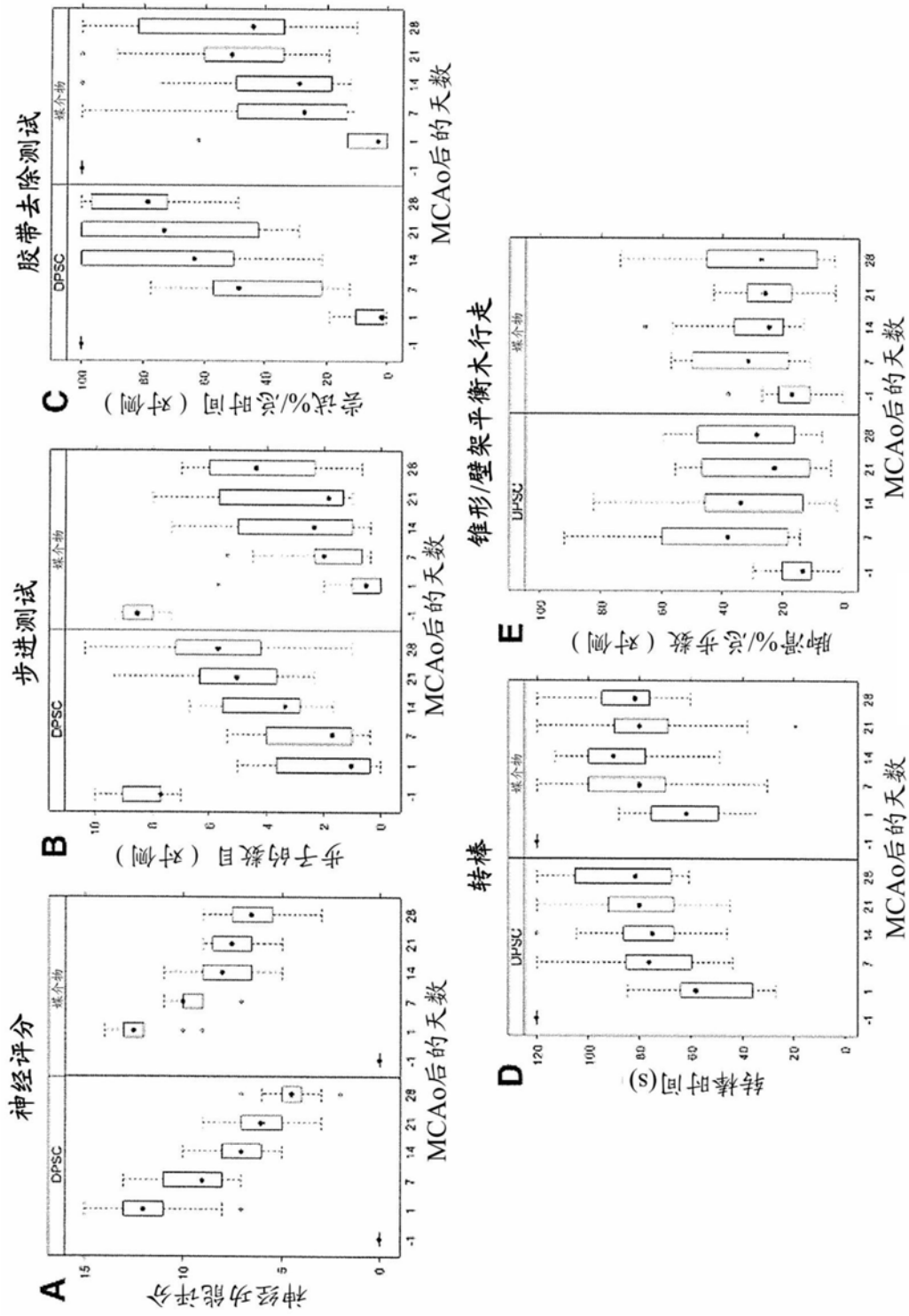


图6

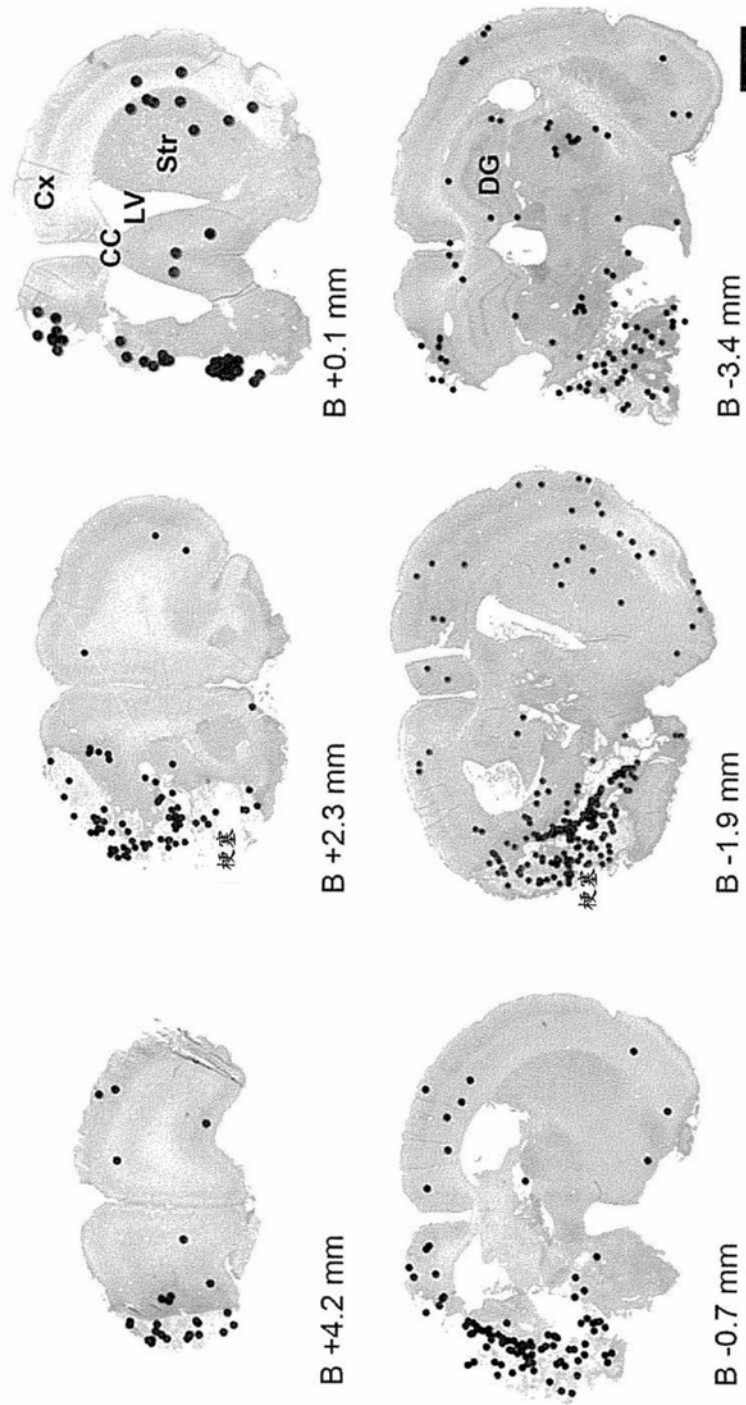


图7

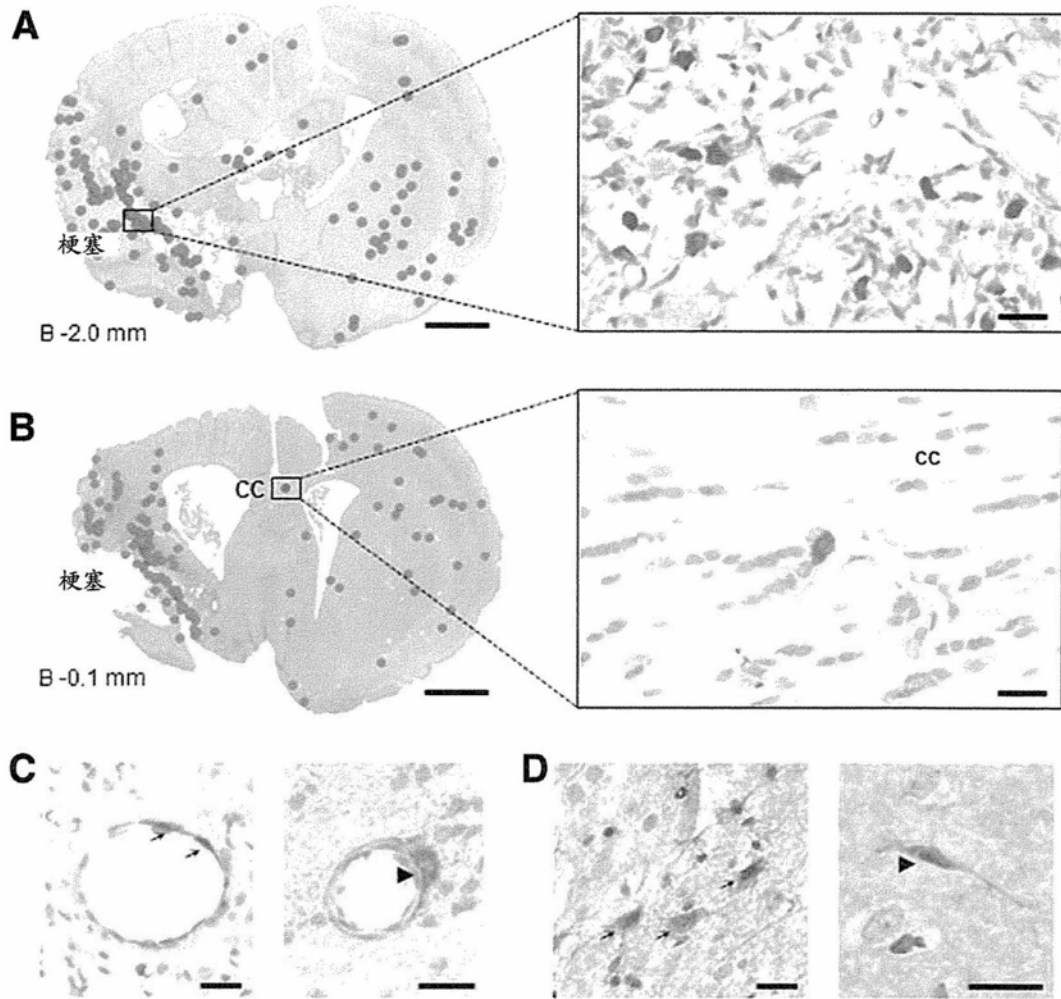


图8

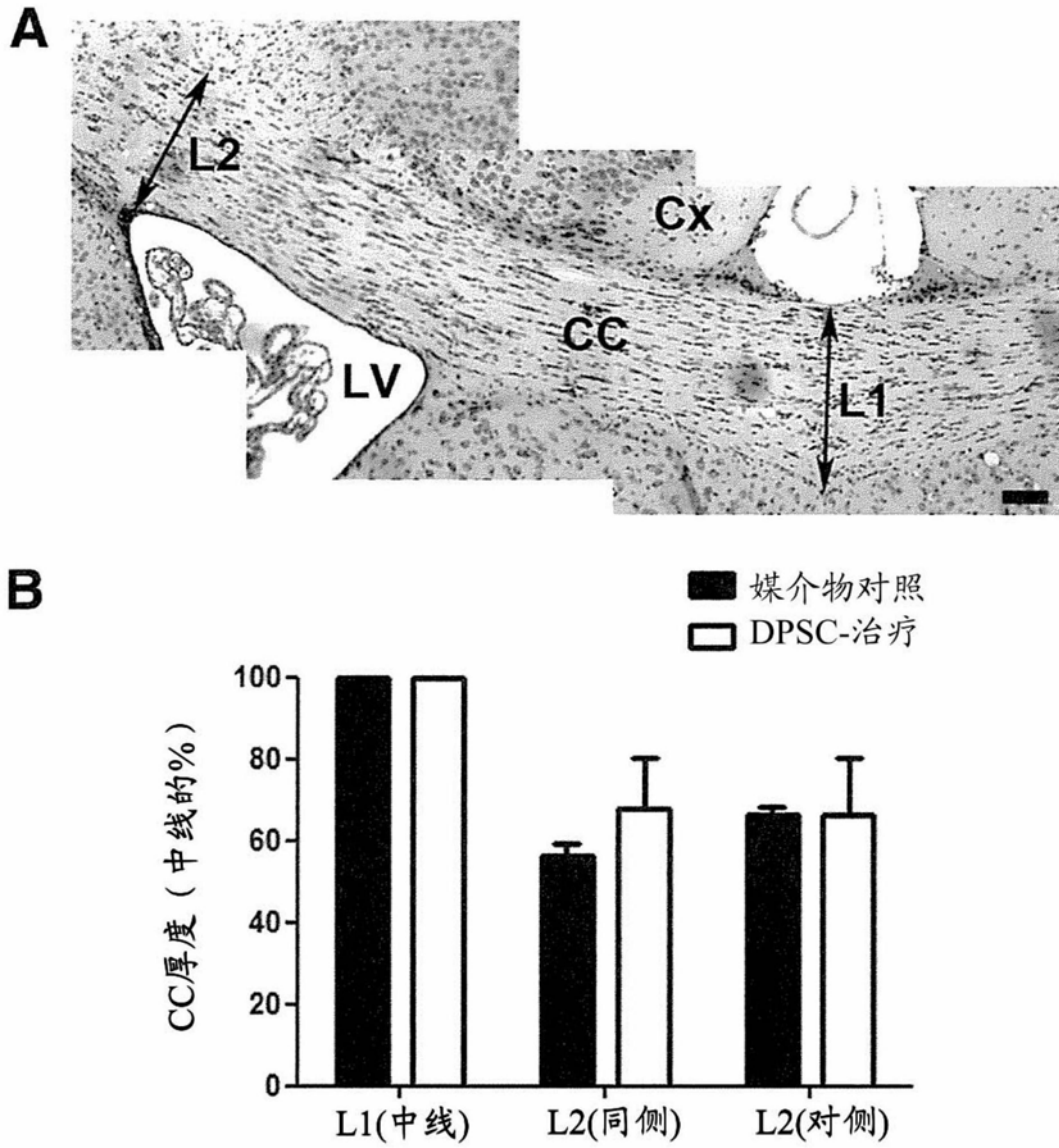


图9

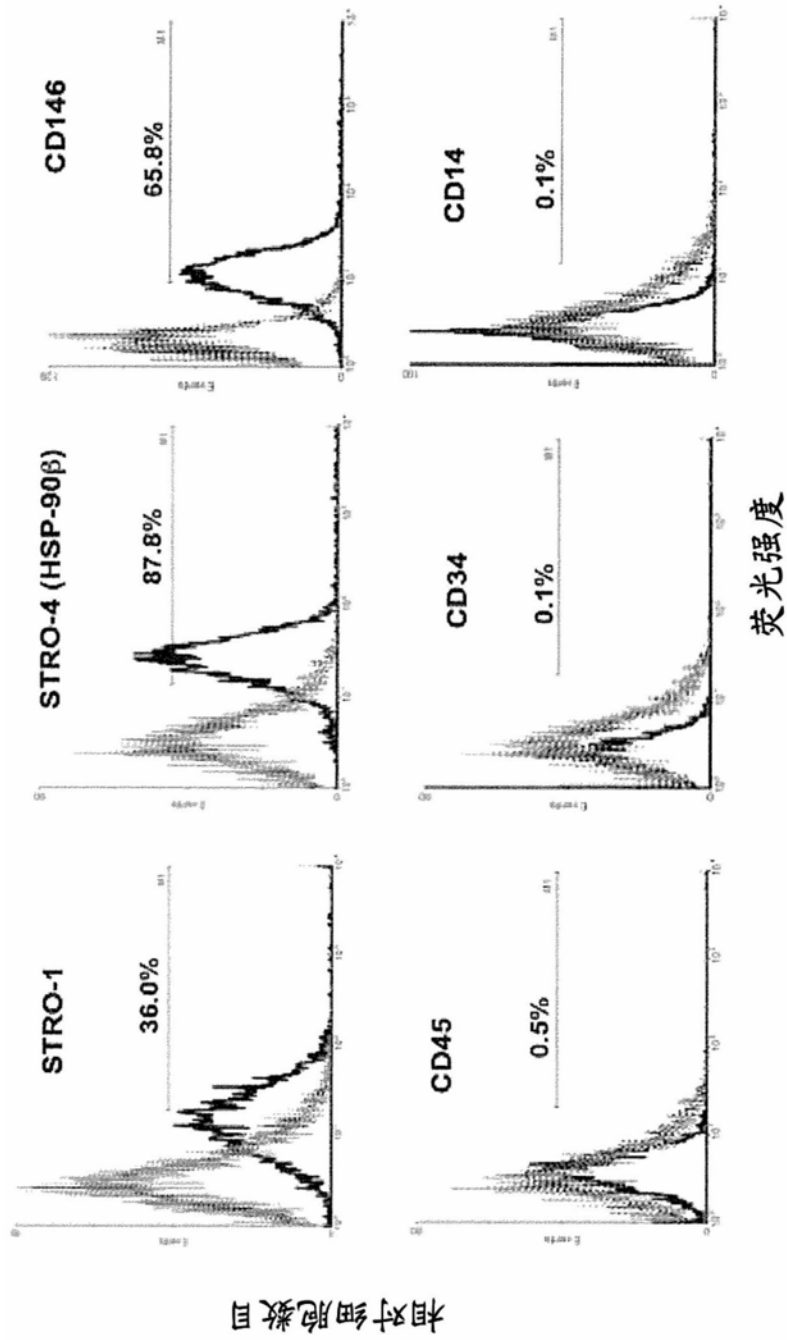


图10