



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103635800 B

(45)授权公告日 2017.02.15

(21)申请号 201280017773.X

(22)申请日 2012.02.10

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103635800 A

(43)申请公布日 2014.03.12

(30)优先权数据  
201100995-8 2011.02.11 SG

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2013.10.10

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/SG2012/000039 2012.02.10

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/108842 EN 2012.08.16

(73)专利权人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡城

(72)发明人 林赛娟

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司  
72003

代理人 吴小瑛 王芝艳

(51)Int.Cl.  
G01N 33/48(2006.01)

(56)对比文件  
WO 2009105044 A1, 2009.08.27,  
WO 2006007529 A3, 2006.08.31,  
WO 2007015174 A2, 2007.02.08,  
CN 1426461 A, 2003.06.25,

审查员 于园园

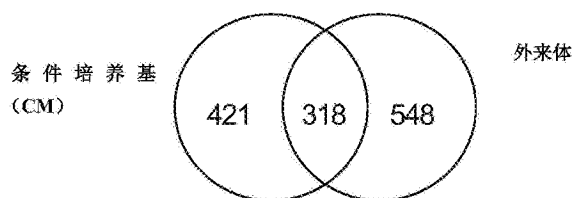
权利要求书2页 说明书46页 附图19页

## (54)发明名称

检测治疗性外来体的方法

## (57)摘要

本发明人描述了一种检测治疗性外来体的方法,所述方法包括检测外来体的活性。所述活性可以选自以下组:(a)免疫调节活性;(b)补体抑制活性;(c)蛋白酶体活性;(d)糖酵解酶活性;(e)抗氧化活性;(f)细胞外基质(ECM)修饰活性;(g)NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性;(h)离子稳态活性;以及(i)分子伴侣活性。如果所述外来体被检测到具有一种或多种这些活性,所述外来体可能包括具有治疗活性的治疗性外来体。



1. 一种测定间充质干细胞外来体是否包含治疗活性的方法,以使外来体可用于在自身免疫疾病中增强组织修复或抑制疾病进展,所述方法包括检测外来体的免疫调节活性,所述免疫调节活性通过检测外来体中的或外来体的选自下组的蛋白的活性而进行检测:二聚糖(GenBank登录号AK092954)、内质网素(GenBank登录号AY040226)、HSP60(GenBank登录号M34664.1,AAA36022.1)、HSP70(GenBank登录号AB023420.1,BAA75062.1), $\beta$ 防御素2(GenBank登录号AJ000152)、纤维蛋白原 $\alpha$ (NCBI参考序列号NM\_021871)、纤维蛋白原 $\beta$ (NCBI参考序列号NM\_001184741)、纤维蛋白原 $\gamma$ (NCBI参考序列号NM\_000509)、纤连蛋白(NCBI参考序列号NM\_212482)、腱糖蛋白C(NCBI参考序列号NM\_002160)、S100蛋白S100A11(GenBank登录号D38583)、S100蛋白S100A13(GenBank登录号AK097132)、S100蛋白S100A8(GenBank登录号BC005928)、S100蛋白S100A9(GenBank登录号BC047681)和S100蛋白S100P(GenBank登录号X65614),且当检测到蛋白的该活性时确定外来体包含治疗活性。

2. 根据权利要求1的方法,其中外来体利用人胚胎干细胞起源的间充质干细胞进行生产。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中自身免疫疾病选自移植物抗宿主病(GVHD)、克罗恩病、系统性红斑狼疮(SLE)、1型糖尿病、多发性硬化或肌萎缩侧索硬化(ALS)。

4. 根据权利要求1或2的方法,其中外来体能够激活促炎和抗炎先天性免疫反应、通过先天性免疫系统诱导抑制的适应性免疫反应,和/或其中外来体不能激活炎症适应性免疫反应。

5. 一种检测治疗性外来体的方法,其包括以下步骤:(a)从间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)中分离外来体,以及(b)检测所分离的外来体中的权利要求1所列的活性。

6. 一种检测治疗性外来体的方法,其包括以下步骤:(a)从间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)中分离外来体,并包括从其它组分中基于分子量、尺寸、形状、组成或生物活性分离外来体,以及(b)检测所分离的外来体中的权利要求1所列的活性。

7. 一种生产外来体的方法,所述方法包括:(a)获得间充质干细胞条件培养物(MSC-CM);(b)浓缩间充质干细胞条件培养物;(c)将浓缩的间充质干细胞条件培养物进行体积排阻色谱;(d)选择表现出动态光散射的UV吸收的部分;并且检测外来体中权利要求1所列的活性。

8. 根据权利要求7所述的生产外来体的方法,其中(b)中用超过1000kDa的膜进行超滤来浓缩间充质干细胞条件培养物。

9. 根据权利要求7或8所述的生产外来体的方法,其中(c)中使用TSK Guard柱SWXL,6x40mm或TSK凝胶G4000SWXL,7.8x300mm柱来将浓缩的间充质干细胞条件培养物进行体积排阻色谱。

10. 根据权利要求7或8所述的生产外来体的方法,其中(d)中在220nm处选择表现出动态光散射的UV吸收的部分。

11. 根据权利要求9所述的生产外来体的方法,其中(d)中在220nm处选择表现出动态光散射的UV吸收的部分。

12. 根据权利要求7或8所述的生产外来体的方法,其中(d)中由准弹性光散射(QELS)检测来选择表现出动态光散射的UV吸收的部分。

13. 根据权利要求9所述的生产外来体的方法,其中(d)中由准弹性光散射(QELS)检测

来选择表现出动态光散射的UV吸收的部分。

14. 根据权利要求10所述的生产外来体的方法,其中(d)中由准弹性光散射(QELS)检测来选择表现出动态光散射的UV吸收的部分。

15. 根据权利要求11所述的生产外来体的方法,其中(d)中由准弹性光散射(QELS)检测来选择表现出动态光散射的UV吸收的部分。

16. 根据权利要求7或8所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为11-13分钟来洗脱收集组分。

17. 根据权利要求9所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为11-13分钟来洗脱收集组分。

18. 根据权利要求10所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为11-13分钟来洗脱收集组分。

19. 根据权利要求11所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为11-13分钟来洗脱收集组分。

20. 根据权利要求12所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为11-13分钟来洗脱收集组分。

21. 根据权利要求13所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为11-13分钟来洗脱收集组分。

22. 根据权利要求14所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为11-13分钟来洗脱收集组分。

23. 根据权利要求15所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为11-13分钟来洗脱收集组分。

24. 根据权利要求7或8所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为12分钟来洗脱收集组分。

25. 根据权利要求9所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为12分钟来洗脱收集组分。

26. 根据权利要求10所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为12分钟来洗脱收集组分。

27. 根据权利要求11所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为12分钟来洗脱收集组分。

28. 根据权利要求12所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为12分钟来洗脱收集组分。

29. 根据权利要求13所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为12分钟来洗脱收集组分。

30. 根据权利要求14所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为12分钟来洗脱收集组分。

31. 根据权利要求15所述的生产外来体的方法,其中(d)包括以保留时间为12分钟来洗脱收集组分。

## 检测治疗性外来体的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学、细胞生物学、分子生物学和遗传学领域。本发明涉及医学领域。

### 背景技术

[0002] 外来体一度被认为是细胞的“垃圾袋”，用来丢弃不需要的蛋白质<sup>1</sup>。然而，外来体越来越多地被认为具有重要的生理功能，尤其是在细胞通讯中。

[0003] 外来体是许多细胞类型都有分泌的50-100nm的双脂质膜泡<sup>2</sup>。它们属于一类叫做微粒的分泌的细胞产物，其广泛囊括了所有分泌的膜泡。除了外来体，微粒还包括微泡(100-1000nm)、核外粒体(50-200nm)、膜颗粒(50-80nm)、外来体状囊泡(20-50nm)和凋亡囊泡(50-500nm)。这些不同类别的微粒的主要区别参数是它们的大小，其中有最明确定义的类别是外来体。

[0004] 外来体在蔗糖中的密度为1.10至1.19克/毫升，在100,000g沉淀，具有富含胆固醇的脂质膜，其含有鞘磷脂、神经酰胺、脂筏和暴露的磷脂酰丝氨酸。外来体的生物合成是一个复杂的过程，涉及到通过生物合成和内吞途径的复杂的细胞内膜运输和物质分拣(cargo sorting)。证实这种复杂生物合成的证据就是外来体的明显特征是拥有内质网和核内体的标识，例如Alix、Tsg101、Rab蛋白等等。外来体在通过多泡体(MVBs)与质膜融合而释放之前存储在多泡体内。

[0005] 外来体被发现调节细胞间通讯，特别是在免疫或肿细胞中<sup>3-8</sup>。最近，当本发明人公布了人ESC起源的MSC的外来体把心肌缺血再灌注(MI/R)受伤小鼠模型中的梗死面积减少约50%时，延伸此项功能到包括组织修复<sup>9,10</sup>。这些外来体是使用HPLC上的尺寸排阻而纯化为直径约50-100nm均匀大小的微粒，它们同时携带蛋白质和RNA载荷<sup>9,11,12</sup>。

[0006] 然而，MSC外来体的这种心脏保护作用的机制尚不确定。一部分原因可能是由于本发明人缺乏对外来体的一般生物效能的理解。尽管进行了大量针对来自各种细胞类型和生物液体的外来体的蛋白质组学和RNA概况的分析，外来体的蛋白质和RNA的生物效能在很大程度上仍然未被调查。截至目前，大多数生物效能的研究还局限在免疫细胞对外来体所作出的免疫反应上，特别是树突细胞<sup>2</sup>，但这些生物反应的分子或生化基础还没有被阐明。

### 发明内容

[0007] 为了解决这个缺陷，本发明人对HPLC纯化的外来体进行了全面的蛋白组学分析来首先确定存在于这些外来体中的蛋白，然后使用这些蛋白质来预测外来体内生物活性或潜能类型。这继而通过生化或细胞测定而得以证实。

[0008] 总共检测到了866个独特的基因产物，它们可以根据功能分成32个过度代表的生物过程，这表明外来体有潜力发挥广谱的生物化学或细胞作用。为了评估这种潜力，本发明人选择了这些蛋白，对于这些蛋白，可以评估其生化和/或细胞活动的测定是可以获得的且该测定的总和可以证实外来体广谱的生物化学和细胞潜力，并提供对MSC外来体的心脏保护性质的候选分子机理。

[0009] 这里考察的蛋白质包括分解葡萄糖以生成ATP和NADH的糖酵解酶,增加糖酵解的PFKB3,水解AMP为能够通过腺苷受体激活信号级联的腺苷的CD73,抑制膜攻击复合物(MAC)形成的CD59,和蛋白酶体20S。

[0010] 根据本发明的第一方面,本发明人提供了一种用于检测治疗性外来体的方法。该方法可以包括检测外来体活性。该方法可以包括免疫调节活性。它可以包括补体抑制活性。它可以包括蛋白酶体活性。它可以包括糖酵解酶活性。它可以包括抗氧化活性。它可以包括细胞外基质(ECM)修饰活性。它可以包括NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性。它可能包括离子稳态活性。它可以包括分子伴侣活性。它可包括上述的任何一个或多个活性。

[0011] 活性可以包括免疫调节活性。免疫调节活性可以通过检测表D10中列出的蛋白质的活性来检测。

[0012] 活性可以包括补体抑制活性。补体抑制活性可以通过检测表D1中列出的蛋白质的活性来检测。

[0013] 该活性可以包括蛋白酶体活性。蛋白酶体活性可以通过检测表D2中列出的一个或多个,优选全部蛋白质的活性来检测。

[0014] 该活性可以包括糖酵解酶活性。糖酵解酶活性可以通过检测表D3中列出的一个或多个,优选全部,蛋白质的活性来检测。

[0015] 该活性可以包括抗氧化活性。抗氧化活性可以通过检测表D4中列出的一个或多个,优选全部,蛋白质的活性来检测。

[0016] 该活性可以包括细胞外基质(ECM)修饰活性。细胞外基质(ECM)修饰活性可以通过检测表D5中列出的一个或多个,优选全部,蛋白质的活性来检测。

[0017] 该活性可以包括NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性。NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性可以通过检测表D6中列出的一个或多个,优选全部,蛋白质的活性来检测。

[0018] 该活性可以包括离子稳态活性。离子稳态活性可以通过检测表D7中列出的一种或多种,优选全部,蛋白质来检测。

[0019] 该活性可以包括分子伴侣活性。分子伴侣活性可以通过检测表D8中列出的一种或多种,优选全部,蛋白质来检测。

[0020] 该活性可以包括免疫调节活性。免疫调节活性可以通过检测表D10中列出的一种或多种,优选全部,蛋白质来检测。

[0021] 如果一项活性被检测到,外来体可能能够抑制补体介导的细胞裂解。它也可以可替代的或可附加的,能够减少梗死面积,例如在心肌缺血和再灌注损伤的小鼠或猪模型中检测到的,或其能够降低氧化应激,例如在过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的细胞死亡的体外试验中测定到的。它可以是上述两个活动。

[0022] 如果一项活动被检测到,外来体有可能包括一个具有治疗活性的治疗性外来体。

[0023] 该治疗活性可以包括保护心脏的活性。

[0024] 该治疗活性治疗一个或多个疾病,其选自心力衰竭、骨髓疾病、皮肤疾病、烧伤和退行性疾病如糖尿病、阿尔茨海默病、帕金森氏病、癌症、心肌梗死、皮肤创伤、皮肤失调、皮肤病变、皮炎、银屑病、湿疣、寻常疣、血管瘤、瘢痕瘤、皮肤癌、异位性皮炎、白塞氏病、慢性肉芽肿病、皮肤T细胞淋巴瘤、溃疡、特征是最初的损伤诱导导致炎症和免疫失调导致慢性组织重组的病理状况,包括纤维化和功能丧失,肾缺血性损伤,囊性纤维化,鼻窦炎和鼻炎

或者骨科疾病。

[0025] 本发明的第二方面提供一种方法,其包括以下步骤:(a)从间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)中分离外来体,任选地,包括从其他组分中基于分子量、尺寸、形状、组成或生物活性分离外来体,以及(b)检测所分离的外来体中上述活性,优选通过检测上述一种或多种蛋白质的活性。

[0026] 本发明的第三方面提供生产外来体的方法,所述方法包括:(a)获得间充质干细胞条件培养物(MSC-CM);(b)浓缩间充质干细胞条件培养物,例如用超过1000kDa的膜进行超滤;(c)将浓缩的间充质干细胞条件培养物进行体积排阻色谱,如使用TSK Guard柱SWXL,6×40mm,或TSK凝胶G4000SWXL,7.8x300mm柱;(d)选择UV吸收的部分,例如,在220nm处,表现出动态光散射,如由准弹性光散射(QELS)检测出的;其中,步骤(d)举例包括通过保留时间为11-13分钟,如12分钟来洗脱收集组分;并且检测外来体中上文所述的活性,优选通过检测一种或多种上文所述的蛋白质的活性。

[0027] 本发明的第四方面提供一种检测外来体是否含有治疗活性的方法,该方法包括检测如上所述的酶活性,其中,如果检测到酶活性,那么外来体包含治疗活性。

[0028] 本发明的实施,除另有说明外,将会使用化学、分子生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,其均在本领域普通技术人员的能力范围内。这些技术在文献中都有解释。见,例如J. Sambrook, E. F. Fritsch和T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. 等人, (1995和周期性的补充; *Current Protocols in Molecular Biology*, 第9、13和16章, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree和A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak和James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (编辑), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley和J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. I* by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); *Antibodies: A Laboratory Manual* by Ed Harlow (编辑), David Lane (编辑) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1855. *Handbook of Drug Screening*, 由Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes 编辑 (2001, New York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); 和 *Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench*, 由Jane Roskams和Linda Rodgers 编辑, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3。全部这些文献均通过引用并入本文。

## 附图说明

[0029] 图1是一个图解,其显示先前在MSC条件培养物里鉴定的739种蛋白与在纯化的外来体中鉴定的866种蛋白质的交叉。

[0030] 图2是一个图解,其显示外来体蛋白的蛋白质组分析。外来体中866种基因产物可

以在功能上分成32个过度代表的生物过程和三个未被充分代表的生物过程( $P < 0.001$ )。421个在条件培养物(CM)中发现但不存在于外来体中的蛋白按照功能分成11过度代表和2个未被充分代表的生物过程。黑条代表外来体中的基因产物的作用,白条代表在CM中找到但在外来体中未找到的基因产物的作用。

[0031] 图3A至3D是显示外来体调节糖酵解的示意图。

[0032] 图3A是糖酵解的示意图。

[0033] 图3B是条件培养物(CM)和外来体(EXO)中磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、磷酸甘油酸酯激酶(PGK)、丙酮酸激酶M2亚型(PK<sub>M2</sub>)和pPFKFB3的Western印记分析。

[0034] 图3C是MSC外来体中GAPDH、PGK和PK<sub>M2</sub>通过使用市售的测定试剂盒测定ATP或丙酮酸的生产来测定的酶活性。一个单位(U)的酶活性被定义为在37°C下每分钟产生1微摩尔产物。

[0035] 图3D,外来体对寡霉素处理的细胞中ATP生产的影响。H9C2心肌细胞用台氏缓冲液(Tyrode's buffer)洗涤两次,然后在含有20 $\mu$ mol线粒体抑制剂、寡霉素、6mmol葡萄糖培养基,有或无0.1 $\mu$ g/ml外来体的台氏缓冲液中孵育15分钟、30分钟和60分钟。细胞ATP浓度使用ATPlite1步发光ATP检测测定系统测量,并相对于没有外来体、15分钟处的样品进行标准化。<sup>\*</sup> $p=0.0173$ ,<sup>\*\*</sup> $p=0.0090$

[0036] 图4A和4B是显示外来体中20S蛋白酶体的示意图。

[0037] 图4A, MSC条件培养物(CM)和外来体(Exo)使用特异于PMSA1-7肽的抗体的Western印迹分析。

[0038] 图4B,使用市售的蛋白酶体活性测定试剂盒(Millipore)测定MSC外来体中的蛋白酶体活性。蛋白酶体活性通过测量荧光探针肽在乳胞素(lactacystin)(一种蛋白酶体抑制剂)存在或不存情况下的降解速率来测量。一个单位(U)酶活性被定义为在37°C下每分钟产生1 $\mu$ mol产物。<sup>\*</sup> $P=0.00023$

[0039] 图5A至5C是显示外来体通过NT5E(外生-5'-外核苷酸酶CD73)磷酸化ERK和AKT的示意图。

[0040] 图5A,使用特异性抗体针对MSC CM和外来体的CD73的Western印迹分析。

[0041] 图5B,条件培养基(CM)和外来体(Exo)中CD73活性通过来源于AMP水解的磷酸根离子的产生而测量。

[0042] 图5C, H9C2细胞血清饥饿过夜,然后在有或没有1mM茶碱的培养基中温育一小时。然后将细胞在已用50 $\mu$ M的AMP、0.1 $\mu$ g/ml外来体或AMP和外来体预是温育30分钟的培养基中暴露5分钟。然后将这些细胞收获并裂解。将10 $\mu$ g的总蛋白用1:2000稀释的兔抗pERK的1/2、1:2000稀释的兔抗ERK1/2、1:500稀释的兔抗pAKT或1:500稀释的兔抗AKT进行免疫印记。

[0043] 图6A至6B是显示外来体抑制膜攻击复合物(MAC)形成的示意图。

[0044] 图6A, MSC条件培养物(CM)和外来体(Exo)用CD59特异性抗体进行的Western印迹分析。

[0045] 图6B,洗涤SRBC,然后重新悬浮于含有C5b6和C7的PBS中,存在或不存在外来体。将混合物在37°C下温育15分钟,然后加入C8和C9,用或不用封闭CD59抗体来另外温育30分钟。将细胞离心,由裂解的SRBC释放在上清液中的血红蛋白量通过415nm处的吸光度而测量。阳性对照(总溶血)是用Triton X-100完全裂解的细胞的上清液。阴性对照是不加补充成分的

样品。阳性对照的吸光度值归一化到100% \*P=2.8E-06, \*\*P=3.51E-08。

[0046] 图7是显示MSC外来体具有TLR配体的示意图。

[0047] 图8是显示MSC外来体不激活TLR2的示意图。

[0048] 图9是显示MSC外来体激活TLR4的示意图。

[0049] 图10是显示MSC外来体诱导THP-1细胞的促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子的生产的示意图。

[0050] 图11是显示CD4+小鼠T细胞诱导分化成Treg(a)或Th17(b)细胞的的示意图。

[0051] 图12A和图12B是显示通过先天免疫调节适应性免疫的示意图。

[0052] 图13是显示外来体的伴刀豆球蛋白A激活的淋巴细胞增殖试验的示意图。

## 具体实施方式

[0053] 哺乳动物细胞分泌含有蛋白质和RNA的外来体。可以假设,可以从健康的细胞中收获和纯化这些外来体用于补充和支持患病或不良细胞中的细胞资源,使这些细胞开始恢复和修复。例如,本发明人已经证明,从人类胚胎干细胞来源的间充质干细胞获得的外来体可以挽救急性心肌缺血-再灌注损伤后的心肌细胞免于细胞死亡。在这里,本发明人描述了这些外来体的生化性质。这些性质可以用来识别、选择或评估外来体制剂用于治疗病变的或不良细胞的治疗潜力。

[0054] 处于作为损伤或疾病后果的苦恼中的细胞往往有着相似的细胞功能障碍。它们增加的线粒体膜通透性造成了ATP和NADH生产的减少,ROS水平增加和离子稳态的丧失,包括Na、Ca、K和Cl。也有由于变性蛋白质的积累导致的ER应激、包涵体形成和过度先天免疫反应。为了开始恢复和修复的过程,细胞必须首先纠正这些细胞功能障碍。由于外来体是含有蛋白质和RNA的分泌的磷脂囊泡,它们有传递可以迅速启动必要的细胞活性以纠正这些细胞功能障碍的酶和RNA的潜能。

[0055] 在这里,本发明人描述了治疗性外来体的生化性质。这些生化性质包括

[0056] a. 补体活性的抑制(下表D1)

[0057] b. 降解变性蛋白质的蛋白酶体活性(下表D2)

[0058] c. 生成ATP和NADH的糖酵解酶(下表D3)

[0059] d. 生成NADPH的戊糖磷酸途径的酶

[0060] e. 抗氧化活性(下表D4)

[0061] f. MMP/TIMP活性(下表D5)

[0062] g. 激活生存信号通路的CD73外生-5'外核苷酸酶活性(下表D6)

[0063] h. 恢复离子稳态的ATP酶膜通道或转运通道,如钙、钠、质子、钾和氯通道(下表D7)

[0064] i. 保持蛋白质结构完整性的分子伴侣活性(下表D8)

[0065] 潜在的治疗性外来体不应该只有具有这些生化活性的蛋白质,蛋白质还必须具有酶活性。因此,这些蛋白质的酶活性成为代替外来体制剂的治疗功效的替代标记。

[0066] 本发明人因此提供了大量用于定义、鉴别和评估治疗性外来体的生化测定。

[0067] 检测治疗性外来体

[0068] 本发明人描述了衍生自间充质干细胞(MSC)的颗粒,例如外来体的生物学性质,特别是生化性质。



[0069] 根据这里描述的方法和组合物,外来体包括以下一个或多个:(a)补体抑制活性;(b)蛋白酶体活性;(c)糖酵解酶活性;(d)抗氧化活性;(e)细胞外基质(ECM)修饰活性;(f)NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性;(g)离子稳态活性;(h)分子伴侣活性,可以包括治疗活性,以及(i)免疫调节活性。

[0070] 一种包含这样性质的外来体可以自然治疗一些疾病,如下所述,换言之,是一种治疗性外来体。术语“外来体”在本文档中的使用在上下文允许的情况下应该被理解为包括“治疗性外来体”。

[0071] 外来体可以通过几种手段的任何一种从MSC中获得,例如通过从MSC分泌、出芽或散布。例如,外来体可以从MSC生产、渗出、发射或脱落。如果是细胞培养中的MSC,外来体可被分泌到细胞培养基中。

[0072] 外来体可特别包括囊泡。这里所描述的治疗性外来体可以包括本文所描述的外来体的任何一个或多个性质。

[0073] 外来体可以包括由脂双层限制的囊泡或扁平球体。外来体的可包括40-100nm的直径。外来体可以通过核内体膜的向内出芽形成。外来体可以具有~1.13-1.19克/ml的密度,并在蔗糖梯度上漂浮。外来体富含胆固醇和鞘磷脂,如GM1、GM3、浮舰蛋白(flottillin)和src蛋白激酶Lyn的脂筏标记。外来体可以包括一种或多种存在于间充质干细胞或间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)中的蛋白质,如一个拥有MSC或MSC-CM的特征的或者特异于MSC或MSC-CM的蛋白质。

[0074] 本发明人提供了一个外来体,其包括在MSC中发现的或是在通过培养MSC而条件化的介质中发现的一个或多个含有治疗活性的基因。这样的治疗性外来体可以通过检测显示一个或多个活性的外来体来鉴别,这些活性选自:a)补体抑制活性;(b)蛋白酶体活性;(c)糖酵解酶活性;(d)抗氧化活性;(e)细胞外基质(ECM)修饰活性;(f)NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性;(g)离子稳态活性;(h)分子伴侣活性;以及(i)免疫调节活性。

[0075] 外来体可以包括由MSC分泌的分子。这样一个外来体和包含在其中的分子的任何分子组合(包括特定的蛋白质或多肽)可以被用于补充MSC或被MSC条件化的培养物的活性或者代替MSC或被MSC条件化的培养物,以用于例如治疗或预防疾病的目的。

[0076] 外来体可能包括在细胞骨架中发现的细胞溶质蛋白,如微管蛋白、肌动蛋白和肌动蛋白结合蛋白,细胞内的膜融合和运输,如膜联蛋白和Rab蛋白,信号转导蛋白,如蛋白激酶、14-3-3和异三聚体G蛋白,代谢酶,如过氧化物酶、丙酮酸和脂质激酶和烯醇化酶-1,以及四跨膜蛋白家族,例如CD9、CD63、CD81和CD82。特别是,外来体可以包括一个或多个四跨膜蛋白。外来体可以包括mRNA和/或microRNA。

[0077] 术语“颗粒”,其包括外来体,在本文档中的使用可以被解释为一个独立的实体。所述颗粒可以是间充质干细胞(MSC)或间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)分离出来的物质。该颗粒可以负责至少一个MSC或MSC-CM活性。该颗粒可负责,并执行,实质上大部分或所有的MSC或MSC-CM的功能。例如,该颗粒可以是MSC或MSC-CM的替代品(或生物替代品)。

[0078] 当术语“颗粒”在本文档中使用,其应被理解为包括(只要情况允许)外来体的同义词。

[0079] 外来体可用于MSC或MSC-CM可被投入使用的任何治疗目的。

[0080] 外来体优选具有至少一个间充质干细胞的性质,例如治疗性质。外来体可以具有

生物性质,例如生物活性。外来体可以具有MSC的任何生物活性。例如,外来体可以具有MSC的治疗或恢复活性。

[0081] 已知使用MSC条件化的介质(如间充质干细胞条件化的培养物或MSC-CM,如下所述)包括MSC的生物活性,能够替代MSC本身-参见例WO2009/105044。因此,MSC的生物学性质或生物活性可能对应于经过间充质干细胞条件化的培养物的生物性质或活性。因此,外来体可以包括间充质干细胞条件化的培养物(MSC-CM)的一个或多个生物性质或活性。

[0082] 这里所描述的治疗性外来体可能从间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)中分离出来,并检测以下一种或多种活性的存在:(a)补体抑制活性;(b)蛋白酶体活性;(c)糖酵解酶活性;(d)抗氧化活性;(e)细胞外基质(ECM)修饰活性;(f)NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性;(g)离子稳态活性;(h)分子伴侣活性;以及(i)免疫调节活性。

[0083] 活性检测

[0084] 每一种上述活性均可以在治疗性外来体中通过本领域中已知的多种方式进行检测。例如,相关活性可以通过检测负责治疗性外来体活性的蛋白质或多肽的存在来检测。这可以通过例如使用同源抗体和本领域已知的免疫测定法和Western印迹等检测抗体和蛋白质之间的结合实现。

[0085] 概言之,1个酶活性单位(U)定义为每分钟生产1微摩尔产品所需的活性。

[0086] 检测活性的Western印记方案

[0087] 一个使用Western印迹杂交经由蛋白质或多肽检测活力的范例方案载列如下。

[0088] 在4-12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离12 $\mu$ g外来体,电转染到硝酸纤维素膜上。把膜转移到SNAP i.d.系统(Millipore inc.,Billerica,MA)的膜支架中,封闭并和抗人一抗一起温育,抗人一抗包括小鼠抗GAPDH(1:100稀释),小鼠抗PGK(1:60),小鼠抗PGD(1:60),兔抗PFKFB3(1:60),小鼠抗丙酮酸激酶(PK,1:200),小鼠抗20S蛋白酶体 $\alpha$ 1-7(1:200),小鼠抗CD73(1:60)和小鼠抗CD59(1:200)。然后,印迹与辣根过氧化物酶偶联的第二抗体一起孵育。所用的第二抗体是山羊抗小鼠IgG(1:1250)或驴抗兔IgG(1:1250)。所有的抗体均获得自Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA,除鼠抗PK购自Abcam Inc.,Cambridge,MA外。然后将印迹与HRP-增强的化学发光底物(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA)一起孵育,然后曝光于X射线胶片。

[0089] 液相色谱-质谱(LC MS)或质谱(MS)

[0090] 也可以使用如质谱的其他方法来检测存蛋白质或多肽在外来体中的存在。LC MS在“Basics of LC/MS Primer”(Agilent Technologies)文件中有详细说明,网址为<http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/a05296.pdf>

[0091] 使用液相色谱-质谱(LC MS)或质谱(MS)的一个范例方案载列如下。

[0092] 根据描述(20),将两毫升透析的外来体中的蛋白质进行还原、烷基化和胰蛋白酶消化。然后,通过将消化的混合物通过条件化的Sep-Pak C-18SPE柱(Waters,Milford,MA,美国),并用3%的乙腈(ACN)(JT Baker,Phillipsburg,NJ)和0.1%甲酸(FA)缓冲液清洗两次,并用70%ACN和0.1%FA缓冲液洗脱将样品进行脱盐。然后,将洗脱下来的样品通过真空离心除去有机溶剂干燥至约10%的其初始体积。为了减少样品的复杂性,通过一个配置了Polysulfoethyl SCX柱(200mm $\times$ 4.6mm(PolyLC,美国)的HPLC系统(Shimadzu,日本)进行了离线肽分馏。流动相A(5mM KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>+30%乙腈)和流相B(5mM KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>+30%乙腈+350mM

KCl), 1ml/min。收集8个馏分,并用真空离心干燥。分级的样品被装入到Shimadzu micro HPLC系统的自动进样器,Shimadzu micro HPLC系统在线连接到配备了纳米喷雾源(nanospray source)的LTQ FT超线性离子阱质谱仪(Thermo Electron, Bremen, 德国)。注射入的肽陷入Zorbax300SB-C18富集柱中(5mm x0.3mm, Agilent Technologies, 德国)并在其中脱盐,并且洗脱进入纳米孔径的C18填充柱(75 $\mu$ m x100  $\text{\AA}$ , Michrom Bioresources, Auburn, CA)。使用分流器(splitter to anmmminute)以恒定流速20 $\mu$ L/min到有效流速200 $\mu$ L/min的90 $\mu$ L/min梯度洗脱进入质谱仪的肽。以数据依赖模式、通过进行FTMS中来自于每一个MS扫描的最强烈的峰中的八个峰的MS/MS扫描来操作LTQ。对于每个实验,都通过一个自己编写(home-written)的程序把八个SCX组分的MS/MS(dta)谱合并成一个单一的mascot通用文件。蛋白质鉴定通过内部的Mascot服务器(版本2.2.04, Matrix Science, 英国)在IPI人类蛋白质数据库(版本3.34; 69,164条序列, 29,064,825个残基)中搜索合并后的数据获得。搜索参数是:使用胰蛋白酶的2个错过的分裂的最大值;固定的修饰是半胱氨酸的氨甲酰甲基化修饰,可变修饰是蛋氨酸的氧化。肽前体和片段离子的质量公差分别设定为10ppm和0.8Da。如果发现两个不同的肽具有高于同源性得分的得分,蛋白质鉴定接受为真阳性。

[0093] 补体抑制活性

[0094] 治疗性外来体中补体抑制活性可以通过检测蛋白质的任一个或多个或它们的活性来检测,例如表D1中所列出的,借此鉴定它们为治疗性外来体。

[0095] 表D1

[0096]

蛋白质	GenBank 登录号/ NCBI 参考序列(RefSeq)	同义词
CD59	NM_203329.2, NP_976074.1	

[0097] 表D1。补体抑制活性

[0098] 另外可选的,或额外的,补体介导的细胞裂解活性可通过进行下述测定进行检测。

[0099] 补体介导的细胞裂解实验

[0100] 简单地说,购买来的绵羊红细胞(SRBC)(Innovative Research, Southfield, MI)用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤三次,然后以 $1 \times 10^8$ 细胞/ml重悬在PBS中。纯化的补体成分,C5b6,C8和C9均购自Calbiochem(San Diego, CA)且C7购自Sigma-Aldrich(St Louis, MO)。完整的C5b-9在SRBC上的装配通过在存在或不存在终浓度为0.1 $\mu$ g/ml的外来体的1ml的C5b6(0.1 $\mu$ g/ml)和C7(0.4 $\mu$ g/ml)的每一种温育15分钟(37 $^{\circ}$ C)后开始的。然后洗涤SRBC,用1ml的C8(0.4 $\mu$ g/ml)加C9(0.4 $\mu$ g/ml)、加入或没加入最终浓度为0.05 $\mu$ g/ml的封闭CD59抗体的每一种再培养30min。之后,离心SRBC,上清液中由裂解的SRBC释放的血红蛋白量由415nm处的吸光度测量。总(100%)溶血可以通过用1%(w/v)Triton X-100处理细胞得到。

[0101] 蛋白酶体活性

[0102] 治疗性外来体中的蛋白酶体活性可通过检测载于表D2中的蛋白质的任一个或多个或它们的活性来检测,从而鉴定它们是否是治疗性外来体。

[0103] 表D2

[0104]

蛋白质	GenBank 登录号/ Ref seq	同义词
PSMA1	X61969.1, CAA43961.1	
PSMA2	D00760.1, BAA00657.1	
PSMA3	NM_002788.2, NP_002779.1	
PSMA4	BC005361.1, AAH05361.1	
PSMA5	X61970.1, CAA43962.1	
PSMA6	X59417.1, CAA42052.1	
PSMA7	AF022815.1, AAB81515.1	
PSMB1	D00761.1, BAA00658.1	
PSMB2	D26599.1, BAA05646.1	
PSMB3	BC013008.2, AAH13008.1	
PSMB4	D26600.1, BAA05647.1	
PSMB5	D29011.1, BAA06097.1	
PSMB6	BC000835.2, AAH00835.1	
PSMB7	AJ420455.1	
20S 核心颗粒		
PSMB8	NM_004159.4, NP_004150.1	
PSMB9	NM_148954.2, NP_683756.1	
PSMB10	Y13640.1, CAA73982.1	

[0105] 表D2。蛋白酶体活性

[0106] 另外可选的或额外的,蛋白酶体活性也可以通过进行下述检测进行检测。

[0107] 20S蛋白酶体检测

[0108] 蛋白酶体活性的测定是在存在或不存在乳胞素(特定的20S蛋白酶体抑制剂)时,由20S蛋白酶体从标记的底物LLVY-AMC上的裂解之后,使用20S蛋白酶体活性测定试剂盒(Millipore inc),基于检测荧光团7-氨基-4甲基香豆素(AMC)而进行。简单地说,4 $\mu$ g外来体在25 $\mu$ M乳胞素存在或不存在的条件下和含有LLVY-AMC的反应缓冲液温育。样品和AMC标准在37 $^{\circ}$ C下孵育且在Ex/Em=380/460nm的荧光强度的被监测2小时。

[0109] 单位活性定义

[0110] 20S核心颗粒的1单位酶活性定义为每分钟生产1微摩尔的产品所需的活性。

[0111] 发现外来体含有5.0 $\mu$ U20S核心颗粒活性/ $\mu$ g蛋白。

[0112] 糖酵解酶活性

[0113] 外来体中的糖酵解酶活性可以通过检测表D3中列出的一个或多个蛋白质或它们的活性来检测,从而确定它们能否是治疗性外来体。

[0114] 表D3

[0115]

蛋白质	GenBank 登录号/ NCBI 参考序列(RefSeq)	同义词
GAPDH	AF261085.1, AAF99678.1	
PGK	L00159.1, AAA60078.1	
PGM1	BC019920.1, AAH19920.1	
Enolase2	BC022545.1, AAH22545.1	
PKm2	M23725.1, AAA36449.1	
PFKFB3	CAH73611	
PFKFB3 -磷酸 化形式		
ATP *		
NADH *		

[0116] 表D3。糖酵解酶活性

[0117] \*应理解,ATP和NADH不是蛋白质。然而,它们可以被检测,以检测外来体中糖酵解酶活性,因此,可以用来建立外来体是否是治疗性外来体。相似的,ATP和NADH在细胞中的还原(reduction)(或两者)的检测也可以使用(见上文)。

[0118] 因此,应当理解,在本文的背景下,术语“蛋白质”或“多肽”可以包括如ATP和NADH的小分子。不应将不利的含义联系到表格标题“蛋白质”(或本文档中的其他地方)下的实体检测的引用中,其中实体不是蛋白质物,而实际上是其他类型的实体,例如小分子。因此,本文中的某些表格的标题和其他参考(例如,表D3)为方便起见可能引用“蛋白质”名称的物质,但可能包括对ATP、NADH等(其中这些实体实际上都不是蛋白质)的引用。正如上文所述,这些实体的测定可用于测定治疗性外来体。

[0119] 此外,由于糖酵解酶活性可能会被转移到暴露于外来体的细胞,导致增加的ATP和NADH的生产,检测细胞的ATP或NADH的生产(或两者)可以作为检测在产生的外来体中糖酵解酶活性的一种手段,从而确定它是否是治疗性外来体。

[0120] 丙酮酸激酶检测

[0121] 用细胞提取试剂盒(Biovision,Mountain view,CA)裂解5 $\mu$ g(在12 $\mu$ l中)外来体。裂解的外来体提取物和50 $\mu$ l的市售PK测定试剂盒(Biovision)反应混合物一起温育。在这个检测中,通过PK产生的丙酮酸经丙酮酸氧化酶氧化产生荧光(Ex/Em=535/587nm)。因此,荧光强度增加和产生的丙酮酸的量成比例。

[0122] GAPDH和PGK检测

[0123] GAPDH和PGK活性通过使用两个市售试剂盒,KDalert GAPDH检测试剂盒(AmbionInc.,Austin,TX)和ApoSENSOR ADP/ATP比率检测试剂盒(Biovision)基于糖酵解反应中其下游产品,ATP而测量。简单地说,使用细胞提取试剂盒(Biovision)裂解外来体。为了测量GAPDH活性,10 $\mu$ g的裂解后的外来体被加到含有D-甘油醛-3-磷酸,NAD<sup>+</sup>和Pi的KDalert反应缓冲液中形成1,3-二磷酸甘油酸酯+NADH+H<sup>+</sup>。然后,加入250U/ml的PGK和60 $\mu$ M ADP,从而转换1,3-二磷酸甘油酸酯和ADP为3-磷酸甘油酸酯和ATP。产生的ATP量和GAPD活性成比例,然后使用ATP荧光素酶检测进行测量。为了测量PGK活性,10 $\mu$ g的裂解的外来体被

加入上面的检测产生的1,3-二磷酸甘油酸酯。添加ADP从而允许ATP的形成。ATP量和PGK活性成比例,然后使用ATP荧光素酶检测进行量化。

[0124] 基于糖酵解细胞的检测

[0125] H9C2心肌细胞以每孔30000个细胞的密度接种到96孔板中(多聚赖氨酸包被的)。5小时后,将细胞用台氏缓冲液洗涤两次,然后在含有20 $\mu$ mol寡霉素(Sigma-Aldrich)、6mmol葡萄糖、有或无0.1 $\mu$ g/ml外来体的台式缓冲液中温育15分钟、30分钟和60分钟。细胞ATP浓度使用ATPlite1步发光ATP检测分析系统进行测量(PerkinElmer,Zaventem,比利时)。

[0126] 单位活性定义

[0127] 1个单位的GAPDH(AF261085.1)的酶活性定义为每分钟生产1微摩尔产品所需的活性。

[0128] 发现外来体含有1.1 $\mu$ U的GAPDH活性/ $\mu$ g蛋白质,3.59 $\mu$ U的PGK(L00159.1)活性/ $\mu$ g蛋白质和5.5 $\mu$ U PKm<sub>2</sub>(M23725.1)活性/ $\mu$ g蛋白。

[0129] 抗氧化活性

[0130] 治疗性外来体中的抗氧化活性可以通过检测载于表D4中的任何一个或多个的蛋白质或它们的活性来检测,从而确定它们是否为治疗性外来体。

[0131] 表D4

[0132]

蛋白质	GenBank 登录号/ NCBI 参考序列(RefSeq)	同义词
GAPDH	AF261085.1, AAF99678.1	
PGD (6- 磷酸葡糖脱氢 酶)	BC000368.2, AAH00368.1	
PXDN	AF200348.1, AAF06354.1	
PRDX1	BC021683.1, AAH21683.1	
PRDX6	D14662.1, BAA03496.1	
Catalase	AY028632.1, AAK29181.1	

[0133] 表D4.抗氧化活性

[0134] 细胞外基质(ECM)修饰活性

[0135] 在治疗性外来体中的细胞外基质(ECM)修饰活性可通过检测载于表D5中的任何一个或多个蛋白质或它们的活性来检测,从而确定它们是否为治疗性外来体。

[0136] 表D5

[0137]

蛋白质	GenBank 登录号/ NCBI 参考序列(RefSeq)	同义词
MMP1	X54925.1, CAA38691.1	
MMP2	NM_001127891.1, NP_001121363.1	
MMP3	X05232.1, X05232.1	
MMP10	X07820.1, CAA30679.1	
TIMP1	NM_003254.2, NP_003245.1	
TIMP2	NM_003255.4, NP_003246.1	
TIMP3	NM_000362.4, NP_000353.1	

[0138] 表D5。细胞外基质(ECM)修饰活性

[0139] NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性

[0140] 在治疗性外来体中的NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性可以通过载列于表D6的任何一个或多个蛋白质或它们的活性测试,从而确定它们是否为治疗性外来体。

[0141] 此外,在AMP存在条件下将细胞暴露于有NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性的外来体会诱导AKT和ERK1/2的磷酸化,外来体中或外来体的磷酸化的AKT(即,磷酸化的AKT1,磷酸化的AKT2或磷酸化的AKT3)或磷酸化的ERK1或磷酸化的ERK2(或这些的任何组合)的检测可以用作检测外来体中NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性的一种手段,从而测定它是否是治疗性外来体。

[0142] 表D6

[0143]

蛋白质	GenBank 登录号/ NCBI 参考序列(RefSeq)	同义词
外生-5'- 外核苷酸酶	X55740.1, CAA39271.1	NT5E, CD73
外生-腺苷三磷 酸双磷酸酶	S73813.1, AAB32152.1	CD39
AKT1, 磷酸化 形式	NM_001014432, NP_001014431	
AKT2, 磷酸化 形式	NM_001626, NP_001617	
AKT3, 磷酸化 形式	NM_005465, NP_005456	
ERK1, 磷酸化 形式	NM_001040056, NP_001035145	MAPK3
ERK2, 磷酸化 形式	NM_002745, NP_002736	MAPK1

[0144] 表D6。NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶活性

[0145] CD73检测

[0146] 在外来体中的CD73(NT5E)酶活性通过将2.5 $\mu$ g外来体在pH7.4的含有50 $\mu$ MAMP(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)的100 $\mu$ L Tris缓冲液中孵育而测量。然后用Colorlock金试

剂盒((Innova Biosciences, Cambridge, 英国)按照厂家说明书测定从AMP水解释放的磷酸根离子的量。

[0147] 单位活性定义

[0148] 1单位外生-5'-外核苷酸的酶活性定义为每分钟生产1微摩尔产品所需的活性。

[0149] 发现外来体含有22.04 $\mu$ U外生-5'-外核苷酸酶活性/ $\mu$ g蛋白。

[0150] 离子稳态活性

[0151] 治疗性外来体中的离子稳态活性通过检测载于表D7中的任何一个或多个的蛋白质或它们的活性来测定,从而确定它们是否为治疗性外来体。

[0152] 表D7

[0153]

蛋白质	GenBank 登录号/ NCBI 参考序列(RefSeq)	同义词
PMCA1	P20020	
PMCA4	P23634	
Ca <sup>2+</sup> -依赖的 ATP 酶活性 ATP2B1	J04027.1, AAA74511.1	
Ca <sup>2+</sup> -依赖的 ATP 酶活性 ATP2B4	M25874.1, AAA50819.1	

[0154] 表D7。离子稳态活性

[0155] 分子伴侣活性

[0156] 治疗性外来体中的分子伴侣活性通过检测载于表D8中的任何一个或多个的蛋白质或它们的活性来检测,从而确定它们是否为治疗性外来体。

[0157] 表D8

[0158]

蛋白质	GenBank 登录号/ NCBI 参考序列(RefSeq)	同义词
HSP60	M34664.1, AAA36022.1	
HSP70	AB023420.1, BAA75062.1	
HSP90	M27024.1, AAA63194.1	

[0159] 表D8。分子伴侣活性

[0160] 免疫调节活性

[0161] 治疗性外来体可显示免疫调节活性。

[0162] 先天免疫细胞的适应性免疫调节(综述1-3)

[0163] 免疫系统的存在主要为了通过摧毁非自身的细胞或组织、中和传染性或有毒物质并去除细胞碎片如死亡或濒死细胞来保护生物体抵御疾病。在脊椎动物中,免疫系统由先天免疫系统和适应性免疫系统组成。先天免疫细胞包括树突状细胞、巨噬细胞和嗜中性细胞,且这些细胞被遗传编程以识别传染性/有毒材料、应激信号、死亡/濒死细胞或者非自身细胞的不变特征。它是进化上保守的,并提供了第一道防线。适应性免疫细胞是T和B淋巴细



胞。它们适应每一种外来的、有毒的或非自身的物质,通过从头产生针对这些材料的特异性受体来靶向中和或摧毁它们。另一方面,先天免疫细胞识别微生物病原体内的保守分子标识,被通常称为病原体相关分子模式和如通过生殖编码模式识别受体(PPR)的应激信号,如包括Toll样受体(TLR)、视黄酸诱导基因1样RNA解旋酶、核苷酸结合低聚域样受体和C型凝集素受体。激活适应性免疫细胞来产生特异性针对传染性或毒性剂的受体是复杂的,并由先天免疫细胞调控。在PPR中,TLR是关于适应性免疫反应调节的、得到最好特征描述的PPR,如IgM、IgG和IgA抗体的生产,和 $T_H1$ ,  $T_H17$ ,  $CD4^+$ 以及 $CD8^+$ T细胞的激活。

[0164] TLR是高保守的I型整合膜糖蛋白。在人类中,截至目前已经发现10个TLR。所有的TLR,除TLR3外,均通过MyD88依赖性途径直接或与TIRAP组合发出信号,最终导致NF $\kappa$ B、激活蛋白1(AP1)或两者的激活和核转位,从而导致生产炎症细胞因子。TLR3和TLR4启动MyD88独立、TRIF依赖信号通路,从而导致NF $\kappa$ B或IRF3的激活和核转位,分别产生炎症细胞因子和I型干扰素。不同的TLR识别不同类别的病原体相关分子模式,例如TLR4识别细菌细胞表面脂多糖,TLR1和TLR2识别肽聚糖,TLR2和TLR6识别脂蛋白,TLR3识别病毒双链RNA,TLR7和TLR8识别病毒单链RNA,TLR9识别细菌和病毒的CpG,TLR5识别鞭毛蛋白。

[0165] TLR的内源性配体(综述4)

[0166] 尽管TLR在调节宿主对传染性物质及其产品的免疫有压倒性的重要性,内源性配体激活TLR信号触发无菌炎症反应正日益被视为TLR的重要功能。迄今为止,许多不同的TLR的内源性配体已被确定(下面的表D9)。TLR被发现和缺血和再灌注损伤、组织修复和再生、自身免疫性疾病和肿瘤发生和肿瘤进展有关。

[0167]

TLR2	<u>二聚糖</u> , <u>内质网素</u> , HMGB1, <u>HSP60</u> , <u>HSP70</u> , 人心脏肌球蛋白, 透明质酸和尿酸单钠晶体
TLR3	mRNA
TLR4	<u>二聚糖</u> , CD138, $\alpha$ 晶状体蛋白 A 链, <u><math>\beta</math>-防御素 2</u> , <u>内质网素</u> , <u>纤维蛋白原</u> , <u>纤连蛋白</u> , 硫酸肝素, HMGB1, <u>HSP22</u> , <u>HSP60</u> , <u>HSP70</u> , <u>HSP72</u> , 透明质酸, 尿酸单钠晶体, OxPAPC, 抵抗素, <u>S100 蛋白</u> , 表面活性剂蛋白 A 和 <u>髓糖蛋白 C</u>
TLR7	RNA 和小干扰 RNA (siRNA)
TLR8	人心脏肌球蛋白和小干扰 RNA (siRNA)
TLR9	DNA 和 HMGB1

[0168] 表D9。TLR和其内源性配体。下划线标出的配体发现也存在于MSC外来体中。

[0169] MSC的免疫调节活性

[0170] MSC在体外显示出免疫调节性质,如抑制同种抗原、有丝分裂原和CD3连接诱导的T细胞增殖,抑制B细胞增殖和天然杀伤细胞的活性<sup>5</sup>。测试基于MSC的干预治疗人类GVHD<sup>6</sup>和克

罗恩病<sup>7</sup>的疗效的临床试验令人鼓舞。然而, MSC的免疫调节性质的基本机制仍然知之甚少。越来越多地, 认为这些性质是由MSC旁分泌介导的。

[0171] 在2008年, 本发明人的小组证实, 经过人类胚胎干细胞起源的MSC(hESC-MSC)条件化的培养物可以缩小缺血/再灌注损伤的猪和老鼠模型的梗死面积<sup>9</sup>, 改善慢性缺血的猪模型中的心脏功能<sup>10</sup>, 且活性成分具有50-200nm的假定直径。此成分随后经HPLC纯化, 确定为外来体<sup>11</sup>。蛋白质组分析显示, 这些外来体包含TLR2和TLR4的内源性配体(表1)。因此, MSC外来体有激活TLR2和TLR4和促进MSC的免疫调节活性的潜力。

[0172] 治疗性外来体中的免疫调节活性可通过检测载于表D10中的任何一个或多个蛋白质或它们的活性来测定, 从而确定它们是否为治疗性外来体。

	变体	GenBank 登录号	NCBI 参考序列 (RefSeq)
	二聚糖	AK092954	NM_001711
	内质网素	AY040226	NM_003299
	HSP60	M34664.1, AAA36022.1	
	HSP70	AB023420.1, BAA75062.1	
	β防御素 2	AJ000152	NM_004942
[0173]	纤维蛋白原	α	NM_021871
		β	NM_001184741
		γ	NM_000509
	纤连蛋白		NM_212482
	腱糖蛋白 C		NM_002160
	S100 蛋白	S100A11	D38583 NM_005620
		S100A13	AK097132 NM_001024212
		S100A8	BC005928 NM_002964
		S100A9	BC047681 NM_002965
		S100P	X65614 NM_005980

[0174] 表D10

[0175] 间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)

[0176] 条件细胞培养物, 例如间充质干细胞条件培养物(MSC-CM), 可通过在细胞培养基中培养间充质干细胞(MSC)或其子代或由其衍生的细胞系; 并分离所述细胞培养物而获得。间充质干细胞可通过以下方法生产, 所述方法包含通过分散胚胎干(ES)细胞集落获得细胞。所述细胞或其子代, 可在包含FGF2的无血清培养基中, 在没有共培养的条件下增殖。

[0177] 可通过多种方法生产或分离外来体。此类方法可包括从间充质干细胞(MSC)分离外来体。此类方法可包括从间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)分离外来体。例如, 可基于外来体的任何性质, 将外来体与非相关组分分离。例如, 可基于分子量、大小、形状、组分或生物活性分离外来体。例如, 如本文他处用于分子量测试所述的, 可使用由适合的截断分子量或大小的膜的过滤。在间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)的分级期间, 可使用外来体的一种或多种生物活性追踪其活性。

[0178] 免疫调节活性测试

[0179] 可使用THP-1细胞和遗传修饰的THP-细胞系/HEK报告细胞系评估外来体的免疫调节活性。此类细胞系描述于下文的实施例23中。

[0180] 可使用未修饰的THP-1细胞,通过评估外来体诱导细胞因子产生的能力来评估外来体的免疫调节活性。这详细描述于下文的实施例23中。或者,可使用实施例中所述的替代报告细胞系评估细胞因子产生。例如,如实施例19中所述,可使用具有在NF- $\kappa$ B启动子的转录控制下的稳定转染的分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因的THP1-XBlue,或者MyD88活性缺陷的THP1-XBlue-defMYD。

[0181] 还可通过其抑制伴刀豆球蛋白A-激活的淋巴细胞的增殖的能力来评估外来体的免疫调节活性。这详细描述于下文的实施例28中。

[0182] 还可使用评估外来体的免疫调节活性的其他方法。这些包括使CD4+T细胞暴露于外来体处理的单核细胞,例如THP-1,以测定其是否增强Tregs或Th17产生。这详细描述于下文的实施例26中。

[0183] 外来体性质

[0184] 间充质干细胞的性质可包括间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)的性质。据称产生此类间充质干细胞条件培养物的方法是本领域已知的,并且描述于例如WO2009/105044的实施例1中。

[0185] 所述性质可包括生物性质,例如生物活性。生物活性的实例包括心脏保护作用,降低氧化应激和减少梗死大小。

[0186] 心脏保护作用

[0187] 外来体,特别是治疗性外来体,可具有包括心脏保护作用间充质干细胞和/或间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)的性质。所述心脏保护作用可包括在缺血和/或再灌注期间心脏功能的恢复或维持。

[0188] 心脏保护作用的测试

[0189] 心脏保护作用可使用例如WO2009/105044的实施例5、10、14和20中所述的方法的任意一种或多种进行测试。

[0190] 氧化应激

[0191] 外来体,特别是治疗性外来体,可具有包括减少氧化应激(或细胞保护作用)的能力的间充质干细胞和/或间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)的性质。

[0192] 氧化应激的测试

[0193] 氧化应激的降低可使用例如过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导的细胞死亡的体外测试进行测试。总之,在人白血病CEM细胞中诱导过氧化氢( $H_2O_2$ )介导的氧化应激,并通过台盼蓝-排除监测细胞生存性。将人白血病CEM细胞与外来体、条件培养物或间充质干细胞(带有作为对照的盐水)一起温育,并使用 $50\mu M$   $H_2O_2$ 处理以诱导氧化应激。在 $H_2O_2$ 处理后12、24、36和48小时,使用台盼蓝-排除评估细胞生存性。

[0194] 氧化应激的降低可进一步使用DNA氧化的体内测试进行测试。体内氧化应激还可按如下测试。使用外来体、条件培养物或间充质干细胞(带有作为对照的盐水)处理猪。获取猪心脏的组织切片。通过氧化的DNA的8-OHdG免疫染色量化经处理和未处理的猪的组织切片中的核氧化应激。测试组织切片的强烈核染色指明了DNA氧化和氧化应激。

[0195] 梗死大小

[0196] 外来体,特别是治疗性外来体,可具有包括减少梗死大小的能力的间充质干细胞和/或间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)的性质。

[0197] 梗死大小的测试

[0198] 梗死大小可使用例如W02009/105044的实施例6和13中所述的方法的任意一种或多种进行测试。

[0199] 外来体大小

[0200] 外来体可具有大于100kDa的分子量。其可具有大于500kDa的分子量。例如,其可具有大于1000kDa的分子量。

[0201] 可通过各种方式测定分子量。原则上,可通过大小分级以及通过具有相应截断分子量的膜的过滤测定分子量。随后,可通过跟踪由SDS-PAGE分离的组分蛋白,或通过生物测试测定外来体的大小。

[0202] 通过HPLC动态光散射测定外来体大小

[0203] 仪器装备由在来自Shimadzu Corporation(Kyoto,日本)的VP类软件操作下的带有二元泵、自动注射器、恒温柱加热炉和UV-可见光检测器的液相色谱系统组成。所使用的色谱柱是来自Tosoh Corporation(Tokyo,日本)的TSK Guard柱SWXL,6x40mm和TSK凝胶G4000SWXL,7.8x300mm。以下检测器,Dawn8(光散射)、Optilab(折射率)和QELS(动态光散射)串联在UV-可见光检测器之后。后3个检测器来自Wyatt Technology Corporation(California,美国),并由ASTRA软件操作。通过大小排除分离样品组分,即较大的分子在较小分子之前洗脱。所述使用的洗脱缓冲液是具有150mM NaCl的20mM磷酸缓冲液,pH7.2。将此缓冲液通过0.1 $\mu$ m的孔径过滤,并在使用前脱气15分钟。以0.5ml/min的流速平衡色谱系统,直到Dawn8中的信号稳定在约0.3检测器电压单位。UV-可见光检测器设置在220nm,并将柱炉平衡至25 $^{\circ}$ C。洗脱模式为等度,并且运行时间为40分钟。样品的注射体积在50至100ml的范围。外来体的峰与所有其他峰相比的面积%由UV-可见光检测器积分计算。通过QELS和Dawn8检测器计算水力半径Rh。取峰顶的最高计数率(Hz)为Rh。收集在220nm显现的分离组分的峰作为用于进一步表征研究的分离物。

[0204] 通过SDS-PAGE测定分子量

[0205] 外来体可具有大于100kDa的分子量。例如,外来体可以如此,以在进行过滤时,使具有小于100kDa分子量的外来体的大部分蛋白分离到大于100kDa分子量的保留物中。类似地,在使用500kDa截断值的膜进行过滤时,具有小于500kDa分子量的外来体的大部分蛋白分离到大于500kDa分子量的保留分离物中。这表明外来体可具有大于500kDa的分子量。

[0206] 通过生物活性测定分子量

[0207] 外来体可具有大于1000kDa的分子量。例如,外来体可以如此,以在使用截断分子量为1000kDa的膜进行分离时,使相关生物活性基本或主要保留在保留分离物中。可选地或此外,生物活性可不存在于滤液分离物中。生物活性可包括本文他处所述的外来体的任何生物活性。

[0208] 通过梗死大小测定分子量

[0209] 例如,生物活性可包括,如在心肌缺血和再灌注损伤的任何适合模型中测定的,梗死大小的减少。例如,如W02009/105044的实施例中所述,在小鼠或猪模型中测试生物活性。

[0210] 总之,通过由缝合结扎的30分钟左冠状动脉(LCA)梗塞诱导心肌缺血,并通过去除缝合发动再灌注。在再灌注之前5分钟,通过尾静脉经静脉内使用包含外来体的液体(例如,未分离的MSC-CM)、滤液(例如<100或1,000kD的分离物)、保留物(例如>1000kD的分离物)或盐水处理小鼠。24小时后,切除心脏。在切除前,通过再启动LCA,随后通过主动脉灌注Evans蓝,测定危险区面积(AAR)。

[0211] AAR定义为没有被染料染色的面积,并且表示为左室壁面积的百分比。使用Evans蓝和TTC,在24小时后评估梗死大小。当使用间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)和保留物(例如>1000kD)分离物处理的动物中的相对梗死大小在与盐水相比显著减少时,这表明外来体具有高于膜的相对截断值的分子量(例如,大于1000kDa)。

[0212] 外来体分子量

[0213] 外来体可具有大于2 $\mu$ m的大小。外来体可具有大于5 $\mu$ m、10 $\mu$ m、20 $\mu$ m、30 $\mu$ m、40 $\mu$ m或50 $\mu$ m的大小。外来体可具有大于100 $\mu$ m的大小,例如大于150 $\mu$ m。外来体可具有实质上200 $\mu$ m或更大的大小。

[0214] 外来体可具有一定范围的大小,例如2 $\mu$ m至20 $\mu$ m,2 $\mu$ m至50 $\mu$ m,2 $\mu$ m至100 $\mu$ m,2 $\mu$ m至150 $\mu$ m或2 $\mu$ m至200 $\mu$ m之间。外来体可具有20 $\mu$ m至50 $\mu$ m、20 $\mu$ m至100 $\mu$ m、20 $\mu$ m至150 $\mu$ m或20 $\mu$ m至200 $\mu$ m之间的大小。外来体可具有50 $\mu$ m至100 $\mu$ m、50 $\mu$ m至150 $\mu$ m或50 $\mu$ m至200 $\mu$ m之间的大小。外来体可具有100 $\mu$ m至150 $\mu$ m或100 $\mu$ m至200 $\mu$ m之间的大小。外来体可具有150 $\mu$ m至200 $\mu$ m之间的大小。

[0215] 可通过各种方式测定大小。原则上,可通过大小分级,以及通过具有相应截断分子量的膜的过滤测定大小。随后,可通过跟踪由SDS-PAGE分离的组分蛋白,或通过生物测试测定外来体的大小。

[0216] 还可以通过电子显微镜测定大小,如W02009/105044的实施例21中所述。

[0217] 组成

[0218] 外来体可包含由间充质干细胞分泌的一种或多种蛋白。外来体可包含存在于间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)中的一种或多种蛋白。

[0219] 例如,外来体可包含10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多或70%或更多的这些蛋白。外来体可包含实质上约75%的这些蛋白。所述蛋白可通过参考一系列蛋白或一系列基因的基因产物限定。

[0220] 可包含在外来体内的蛋白和基因产物描述于例如W02009/105044。

[0221] 外来体

[0222] 可通过本领域中已知并且描述于例如W02009/105044中的方式分离赋予抵抗再灌注损伤的心脏保护作用的分泌中的活性组分,例如外来体。活性组分可包含由间充质干细胞(MSC)分泌的外来体。

[0223] 外来体是在晚期内吞区室(多泡体)中形成的小膜泡,在1983年首次描述为由网状细胞分泌,随后发现由很多细胞类型分泌,包括各种造血细胞、造血或非造血起源的肿瘤和上皮细胞。它们是不同的于最近描述的“核糖核酸酶复合物”的独特实体,也称作外来体。

[0224] 可通过形态和生物化学参数限定外来体。因此,本文所述的外来体可包含这些形态或生物化学参数的一种或多种。

[0225] 外来体通常定义为“茶碟样”泡,或由脂双层限定的直径40-100nm的扁平球体,并

且通过内涵体膜的向内出芽形成。类似于所有脂质泡且不同于凋亡细胞释放的蛋白聚集物或核小体片段,外来体具有 $\sim 1.13-1.19\text{g/ml}$ 的密度并且漂浮在蔗糖梯度上。外来体富含胆固醇和鞘磷脂以及脂筏标记,例如GM1、GM3、浮舰蛋白和src蛋白激酶Lyn,表明其膜富含脂筏。

[0226] 已检测了来自不同细胞类型和不同物种的外来体的分子组成。通常,外来体包含看来常见于所有外来体的普遍存在的蛋白,以及细胞类型特异性的蛋白。此外,来自相同细胞类型但不同物种的外来体中的蛋白高度保守。普遍存在的外来体相关蛋白包括见于细胞骨架中的胞浆蛋白,例如微管蛋白、肌动蛋白和肌动蛋白结合蛋白;细胞内膜融合物和转运物,例如膜联蛋白和rab蛋白;信号转导蛋白,例如蛋白激酶、14-3-3和异三聚G蛋白;代谢酶,例如过氧化物酶、丙酮酸和脂质激酶,以及烯醇化酶-1和四跨膜蛋白家族,例如CD9、CD63、CD81和CD82。四跨膜蛋白在外来体中高度富集,并且已知参与大分子复合体和膜亚结构域的组织。

[0227] 外来体中的细胞类型特异性蛋白的实例是来自表达II型MHC的细胞的外来体中的II型MHC分子、树突细胞衍生的外来体中的CD86、T细胞衍生的外来体上的T细胞受体等。显著地,外来体不包含核、线粒体、内质网或高尔基体来源的蛋白。此外,外来体中不存在高丰度的质膜蛋白,表明它们不是质膜的简单片段。很多报道的普遍存在的外来体相关蛋白也存在于hESC-MSc分泌的蛋白质组学图谱中。

[0228] 还已知外来体包含mRNA和microRNA,其可递送至另一个细胞,并且可以在此新位置发挥功能。外来体的生理功能仍很少定义。认为其辅助消除陈旧蛋白、回收蛋白、介导感染性颗粒(例如朊病毒和病毒)的传播、诱导补体抗性、推动免疫细胞间通讯,以及转送细胞信号。外来体现已用于癌症治疗的免疫疗法中。

[0229] 来自间充质干细胞的治疗性外来体的应用

[0230] 如上文和下文所述,外来体,包括治疗性外来体,可用作MSC或MSC-CM的替代物。

[0231] 具体地,治疗性外来体可用于目前使用的或在将来可使用的MSC或MSC-CM的任何治疗目的。

[0232] 本文所述的方法和组合物显然能够从间充质干细胞生产治疗性外来体。因此,间充质干细胞的任何应用可等同地适用于来自间充质干细胞的治疗性外来体。

[0233] 本文所述的方法和组合物产生的间充质干细胞和分化的细胞可用于疾病的治疗,或用于制备用于疾病治疗的药物组合物。此类疾病可包括可通过再生疗法治病的疾病,包括心脏衰竭、骨髓疾病、皮肤疾病、烧伤;退行性疾病,如糖尿病、阿尔茨海默病、帕金森氏病等,以及癌症。因此,来自MSC的治疗性外来体可用于治疗此类疾病。

[0234] 来自间充质干细胞的治疗性外来体,例如根据本文所述的方法和组合物制备的那些,可用于各种在商业上重要的研究、诊断和治疗目的。

[0235] 来自间充质干细胞的治疗性外来体可特别用于制备用于治疗疾病的药物组合物。此类疾病可包括可通过再生疗法治病的疾病,包括心脏衰竭、骨髓疾病、皮肤疾病、烧伤;退行性疾病,如糖尿病、阿尔茨海默病、帕金森氏病等,以及癌症。

[0236] 通过本文所述的方法和组合物制成的间充质干细胞具有与骨髓衍生的间充质干细胞(BM-MSC)相似或相同的性质。因此,由这些制成的间充质干细胞和任何分化的细胞,以及由此衍生的治疗性外来体,可用于已知使用BM-MSC的或可使用BM-MSC的任何应用。

[0237] 可通过来自间充质干细胞的外来体治疗的疾病

[0238] MSC的蛋白质组分析显示,表达的蛋白参与3个生物过程:代谢、防御反应和组织分化,包括血管形成、造血作用和骨骼发育。因此,本文所述的来自MSC的治疗性外来体可用于治疗这些功能可能发挥作用的疾病,或其修复或治疗涉及一种或多种这些生物过程的疾病。类似地,单独或组合的,MSC表达的蛋白,优选以本文所述的治疗性外来体的形式,可用于补充或替代MSC或MSC条件培养物的活性,用于例如治疗或预防此类疾病的目的。

[0239] 显示MSC表达的201个基因产物激活心血管生物学、骨骼发育和造血作用中的重要信号途径,例如Jak-STAT、MAPK、Toll-样受体、TGF- $\beta$ 信号和mTOR信号途径。因此,来自MSC等的治疗性外来体可用于预防或治疗涉及这些信号途径中的任一种,或其病因涉及这些号途径中的任一种或多种中的一种或多种缺陷的疾病。

[0240] 因此,此类治疗性外来体可用于治疗心脏衰竭、骨髓疾病、皮肤疾病、烧伤和退行性疾病,如糖尿病、阿尔茨海默病、帕金森氏病等,以及癌症。

[0241] 此类治疗性外来体还可用于治疗心肌梗死、皮肤创伤、皮肤失调、皮肤病变、皮炎、银屑病、湿疹、寻常疣、血管瘤、瘢痕瘤、皮肤癌、异位性皮炎、白塞氏病、慢性肉芽肿病、皮肤T细胞淋巴瘤、溃疡,症状是最初的损伤诱导炎症和免疫失调导致慢性组织重组的病理状况,包括纤维化和功能丧失,肾缺血性损伤、囊性纤维化、鼻窦炎、鼻炎或者骨科疾病。

[0242] 治疗性外来体可用于辅助个体中的伤口愈合、疤痕消退、骨形成、骨移植或骨髓移植。

[0243] 除非文中另有说明,所用术语“条件培养物”不仅包括暴露于MSC的细胞培养基,还包括包含一种或多种,优选基本所有存在于条件培养物中的多肽的组合物。

[0244] 治疗性外来体还可用作MSC分泌或表达的任何蛋白的来源。因此,本发明人提供了生产如包含在治疗性外来体的多肽的方法,所述方法包括获得所述的治疗性外来体,和从所述治疗性外来体分离多肽。

[0245] 治疗性外来体的递送

[0246] 本文所述的治疗性外来体可通过任何适合的方式递送至人体或动物体内。

[0247] 因此,本发明人描述了用于将本文所述的治疗性外来体递送至靶细胞、组织、器官、动物体或人体的递送系统,以及使用所述递送系统将治疗性外来体递送至靶标的方法。

[0248] 递送系统可包含治疗性外来体的来源,例如包含治疗性外来体的容器。递送系统可包含用于将治疗性外来体分发至靶标的分配器。

[0249] 因此,本发明人提供了用于递送治疗性外来体的递送系统,其包含本文中所述的治疗性外来体的来源,以及有效地递送治疗性外来体至靶标的分配器。

[0250] 本发明人进一步提供了此递送系统在用于将治疗性外来体递送至靶标的方法中的应用。

[0251] 用于将流体递送至体内的递送系统是本领域中已知的,并且包括注射、手术滴灌、导管(包括灌注导管),例如美国专利6,139,524中所述的那些,例如药物递送导管,例如美国专利7,122,019中所述的那些。

[0252] 可使用例如本领域中已知(例如,美国设计专利D544,957中所示)的喷鼻剂、吹气器、吸入器等,完成至肺或鼻通道的递送,包括鼻腔递送。

[0253] 可使用主动脉内肾递送导管,例如美国专利7,241,273中所述,完成至肾的递送。

[0254] 显然地,应配置具体递送,以将所需量的治疗性外来体以适合的间隔递送,从而实现最佳治疗。

[0255] 例如,治疗性外来体可用于治疗或预防动脉粥样硬化。在此,治疗性外来体的灌注可通过静脉内完成,以稳定动脉粥样硬化斑块或减少斑块中的炎症。治疗性外来体可通过静脉内灌注而用于治疗或预防败血性休克。

[0256] 治疗性外来体可用于治疗或预防心力衰竭。这可以通过治疗性外来体的慢性冠状动脉内或心肌内灌注,以延迟重构或延迟心力衰竭而实现。治疗性外来体可通过鼻内递送而用于治疗或预防肺炎症。

[0257] 治疗性外来体可用于治疗或预防皮肤病变,例如银屑病。通过使用透皮显微注射针,可采用治疗性外来体的长期递送,直到病变减轻。

[0258] 显然地,递送方法将依赖于有待于递送治疗性外来体的具体器官,并且,本领域技术人员能够相应地确定所采用的方式。

[0259] 例如,在心脏炎症的治疗中,可通过穿过胸壁的直接冠脉内注射,或基于在透视引导下的方法,使用标准经皮导管直接注射到例如心肌的组织中,或从插入到体腔内的支架或导管灌注抑制剂,将治疗性外来体递送至例如心脏组织(即,心肌,心包或心内膜)。

[0260] 可使用任何的各种冠状动脉导管或灌注导管施用化合物。或者,可将治疗性外来体包被或渗入到放置在冠状动脉血管中的支架上。

[0261] 组织再生

[0262] 根据本文所述方法和组合物制成的间充质干细胞和分化的细胞,以及由其衍生的治疗性外来体,还可用于有此需要的人患者中的组织重建或再生。以允许细胞移植至期望组织位置并重建或再生功能性缺陷区域的方式施用细胞。

[0263] 例如,本文所述的方法和组合物可用于调节干细胞的分化。间充质干细胞和分化的细胞以及由其衍生的治疗性外来体可用于组织工程,例如用于皮肤移植物的生长。干细胞分化的调节可用于人工器官或组织的生物工程化,或用于修复术,例如支架。

[0264] 癌症

[0265] 通过本文所述的方法和组合物制成的间充质干细胞和分化的细胞,以及由其衍生的治疗性外来体可用于癌症的治疗。

[0266] 术语“癌症”和“癌(的)”是指或描述哺乳动物中的生理状况,其典型地表征为不受调控的细胞生长。癌症的实例包括但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。

[0267] 此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、胰腺癌、神经胶质细胞瘤如胶质母细胞瘤和神经纤维瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾脏癌、肾癌、前列腺癌,外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头颈部癌。进一步的实例为实体瘤癌,包括结肠癌、乳腺癌、肺癌和前列腺癌;造血系统恶性肿瘤,包括白血病和淋巴瘤、霍奇金病、再生障碍性贫血、皮肤癌和家族性腺瘤性息肉病。进一步的实例包括脑肿瘤、结肠直肠肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、眼部肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤、皮肤肿瘤、睾丸肿瘤、肿瘤、骨肿瘤、滋养细胞肿瘤、输卵管肿瘤、直肠肿瘤、结肠肿瘤、肾肿瘤、胃肿瘤和甲状旁腺肿瘤。还包括乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、恶性黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、卵巢癌、宫颈癌和胆道癌。



[0268] 根据本文所述方法和组合物制成的间充质干细胞和分化的细胞,以及由其衍生的治疗性外来体还可以与抗癌剂组合使用,例如内皮抑素和血管抑素,或细胞毒性剂或化疗剂。例如,药物,如柔红霉素、阿霉素、顺铂、依托泊甙、紫杉醇、多西他赛,和生物碱,如长春新碱,以及抗代谢药物,如甲氨蝶呤。本文使用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞破坏的物质。此术语用于包括放射性同位素(例如I、Y、Pr)、化疗剂和毒素,例如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段。

[0269] 此外,此术语包括致癌基因产物/酪氨酸激酶抑制剂,例如W094/22867中公开的双环安沙霉素类;EP600832中公开的1,2-二(芳基氨基)苯甲酸衍生物;EP600831中公开的6,7-二氨基-二氮杂萘-1-酮衍生物;EP516598中公开的4,5-双(芳基氨基)-酞亚胺衍生物;或抑制酪氨酸激酶与含SH<sub>2</sub>的底物蛋白结合的肽(例如,参见W094/07913)。“化疗剂”是可用于癌症治疗的化学化合物。化疗剂的实例包括阿霉素、多柔比星、5-氟尿嘧啶(5-FU)、阿糖胞苷(Ara-C)、环磷酰胺、塞替派、白消安、细胞毒素(Cytosin)、紫杉醇、氨甲喋呤、顺铂、马法兰、长春碱、博来霉素、足叶乙甙、异环磷酰胺、丝裂霉素C、米托蒽醌、长春新碱、VP-16、长春瑞滨、卡波铂、替尼泊苷、道诺霉素、洋红霉素、氨基蝶呤、更生霉素、丝裂霉素、烟酰胺、Esperamicins(参见美国专利No.4675187)、美法仑和其他相关氮芥,和内分泌疗法(例如乙炔雌酚(DES)、他莫昔芬、LHRH拮抗药、孕激素、抗孕激素等)。

[0270] 获得间充质干细胞(MSC)

[0271] 可以从间充质干细胞条件培养物(MSC-CM)分离或生产外来体,包括治疗性外来体。可通过本领域中已知的任何方法制备适合用于生产条件培养基和外来体的MSC。

[0272] 具体地,可在包含FGF2的无血清培养基中,在没有共培养的条件下增殖通过分散胚胎干(ES)细胞集落获得的细胞或其子代制备MSC。这详述于以下部分中。

[0273] 从hESC获得间充质干细胞(MSC)或MSC样细胞的现有技术方法包括将人端粒逆转录酶(hTERT)基因转染到分化中的hESC(Xu等人,2004),或与小鼠OP9细胞系共培养(Barberi等人,2005)。外源遗传材料和小鼠细胞在这些衍生方案中的应用引入了致肿瘤性,或异型生物质感染剂的感染的不可接受的风险。

[0274] 因此,可以通过使用从分化hESC分离相似或相同(例如同质)MSC群的临床相关且可重复方案而衍生出的MSC制备外来体。通常,所述方法包括将胚胎干(ES)细胞集落分散成细胞。随后,将细胞滤出并增殖。在包含成纤维细胞生长因子2(FGF2)的无血清培养基中,在没有共培养的条件下增殖细胞,从而获得间充质干细胞(MSC)。

[0275] 因此,此方案不需要血清,不需要使用小鼠细胞或遗传操作,并且需要更少的操作和时间,因此,具有高度的可扩展性。此方案可用于从两种不同的hESC系,即HuES9和H-1,以及第三种细胞系Hes-3,分离MSC。通过本文所述方法和组合物获得的人ES细胞衍生的MSC(hESC-MSC)非常类似于骨髓衍生的MSC(hESC-MSC)。

[0276] 胚胎干细胞培养物可包括人胚胎干细胞(hESC)培养物。

[0277] 在一个实施方式中,产生间充质干细胞(MSC)的方法包括在补充FGF2和任选的PDGF AB的培养基中,在没有饲养者支持的条件下,用胰蛋白酶处理和增殖hESC,然后分类CD105+CD24-细胞。

[0278] 此方法可包括在补充FGF2和任选的PDGF AB的培养基中,在没有饲养支持的条件下增殖一周后,从胰蛋白酶化的hESC分类出CD105+、CD24-细胞,以产生hESC-MSC细胞培养

物,其中至少一些,例如基本所有,或所有细胞彼此相似或相同(例如同质)。

[0279] 通过此方法产生的MSC可用于生产间充质干细胞条件培养物(MSC-CM),从该MSC-CM可分离外来体。

[0280] 解聚胚胎干细胞集落

[0281] 生产间充质干细胞的一种方法可包括将胚胎干细胞集落分散或解聚成细胞。

[0282] 胚胎干细胞集落可包括huES9集落(Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J等人,(2004) Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350:1353-1356),或H1ESC集落(Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ等人,(1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282:1145-1147.)。

[0283] 可将集落中的细胞解聚或分散至很大的程度,即至少成凝块。可将集落解聚或分散至集落中的所有细胞都是单细胞的程度,即将集落完全解聚。

[0284] 可使用分散剂完成解聚。

[0285] 分散剂可以是能够使集落中的至少某些胚胎干细胞彼此脱离的任何物品。分散剂可包括破坏集落中细胞之间,或细胞与基质之间,或二者的粘附的试剂。分散剂可包括蛋白酶。

[0286] 分散剂可包括胰蛋白酶。胰蛋白酶处理可在37°C持续例如3分钟左右。随后,可将细胞中和、离心并在滤出前重悬在培养基中。

[0287] 此方法可包括使用胰蛋白酶分散人胚胎干细胞的汇合板,并滤出细胞。

[0288] 解聚可包括至少以下顺序步骤的部分:抽吸、冲洗、胰蛋白酶处理、孵育、移动、淬熄、再接种和分装。采用来自美国圣迭哥Hedrick Lab的以下方案(<http://hedricklab.ucsd.edu/Protocol/COSCell.html>)。

[0289] 在抽吸步骤中,抽吸培养物或通常从容器,例如烧瓶,取出培养物。在冲洗步骤中,使用例如5-10ml体积的缓冲培养基冲洗细胞,所述培养基可不含Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>。例如,可使用不含钙和镁的PBS冲洗细胞。在胰蛋白酶处理步骤中,向容器添加一定量的在缓冲剂中的分散剂,并且滚动容器以使分散剂溶液包被在生长表面。例如,可向烧瓶添加1ml在Hank's BSS中的胰蛋白酶。

[0290] 在培育步骤,将细胞在维持的温度保持一定时间。例如,可将细胞在37°C保持数分钟(例如,2至5分钟)。在移动步骤中,可通过机械作用移动细胞,例如通过刮掉,或通过用手重击容器侧面。细胞应成片脱落并滑落到表面。

[0291] 在淬熄步骤中,向烧瓶添加一定体积的培养基。所述培养基可包含中和剂以终止分散剂的作用。例如,如果分散剂是蛋白酶,例如胰蛋白酶,所述培养基可包含蛋白质,例如血清蛋白,其将结束蛋白酶的活性。在具体实施例中,向烧瓶添加3ml的含血清的细胞培养基,以构成4ml的总体积。可抽打细胞以移动或分散细胞。

[0292] 在再接种步骤中,将细胞再接种到新鲜培养容器并添加新鲜培养基。可按不同的分流比进行多次再接种。例如,可按1/15的稀释比和1/5的稀释比再接种细胞。在具体的实施例中,可通过向25cm<sup>2</sup>烧瓶添加1滴细胞,并向另一个烧瓶中添加3滴细胞以再接种培养基,从而再接种细胞,随后,向每个烧瓶添加7-8ml培养基,以由例如75cm<sup>2</sup>烧瓶提供1/15的稀释比和1/5的稀释比。在分装步骤中,可将细胞分装到新器皿,或任何期望的分流比,并添

加培养基。

[0293] 在具体实施方式中,所述方法包括以下步骤:首先将人ES细胞以非粘附的方式悬浮培养以形成胚体(EB)。随后,将5-10日龄的EB用胰蛋白酶处理,随后滤出为明胶包被的细胞培养板上的粘附细胞。

[0294] 维持细胞培养物

[0295] 所述解聚的细胞可被铺板并维持为细胞培养物。

[0296] 所述细胞可铺在培养皿或基质上,如涂胶的平板。关键地,在没有共培养存在的情况下,例如,在没有饲养细胞存在的情况下生长和繁殖所述细胞。

[0297] 所述细胞培养物中的细胞可例如以5ng/ml、在无血清培养基中生长,该培养基补充一个或更多生长因子,如成纤维细胞生长因子2(FGF2)和任选地血小板衍生生长因子AB(PDGF AB)。当汇合、用胰蛋白酶处理、清洗和再铺板时,所述细胞培养物中的细胞可被1:4的分离或继代培养。

[0298] 无共培养

[0299] 所述细胞可在无共培养条件下培养。术语“共培养”指共同生长的两种或更多种不同种细胞的混合物,例如基质饲养细胞。

[0300] 因此,在典型的ES细胞培养物中,通常用已经处理以使它们不分离的小鼠胚胎皮肤细胞的饲养层包被培养皿的内表面。饲养层提供使ES细胞能够附着和生长的附着表面。此外,饲养细胞释放营养到ES细胞生长所需的培养基中。在本文所述方法和组合物中,可在无此类共培养的情况下培养ES和MSC细胞。

[0301] 所述细胞可作为单层培养,或在无饲养细胞下培养。胚胎干细胞可在无饲养细胞的情况下培养,以建立间充质干细胞(MSC)。

[0302] 分散或解聚的胚胎干细胞可直接铺在培养基质上。该培养基质可包含如皮氏培养皿的组织培养皿。该培养皿可预先处理。细胞可铺在或生长在涂胶的组织培养皿上。

[0303] 培养皿涂胶的范例方案如下。制作蒸馏水中的0.1%明胶溶液,高压蒸汽处理。此溶液可在室温下储存。用明胶溶液覆盖组织培养皿的底部,温育5~15分钟。移除明胶,培养皿待用。为防止低渗裂解,加入细胞前要加入培养基。

[0304] 无血清培养基

[0305] 分散或解聚的胚胎干细胞可在包含无血清培养基的培养基中培养。

[0306] 术语“无血清培养基”可包含不含血清蛋白的细胞培养基,如胎牛血清。无血清培养基是本领域中已知的,并描述在如美国专利5,631,159和5,661,034中。无血清培养基可从如Gibco-BRL(Invitrogen)购得。

[0307] 无血清培养基可不包含蛋白质,因为它可缺乏蛋白质、水解产物和未知组成的成分。无血清培养基可包括化学限定的培养基,其中所有成分都具有已知化学结构。化学限定的不含血清的培养基具有优越性,因为其提供完全确定的体系,此体系消除变异,允许提高重复性和更大的一致性,并减少外源试剂导致的污染的可能。

[0308] 无血清培养基可包括Knockout DMEM media培养基(Invitrogen-Gibco,Grand Island,New York)。

[0309] 无血清培养基可补充有1种或多种诸如血清替代培养基的成分,浓度例如为5%、10%、15%等。无血清培养基可包括或补充有购自Invitrogen-Gibco(Grand Island,New

York)的10%血清替代培养基。

[0310] 生长因子

[0311] 在其中培养分散或解聚的胚胎干细胞的无血清培养基可包括1种或多种生长因子。本领域中已知许多生长因子,包括PDGF、EGF、TGF- $\alpha$ 、FGF、NGF、红细胞生成素、TGF- $\beta$ 、IGF-I和IGF-II。

[0312] 生长因子可包含成纤维细胞生长因子2(FGF2)。培养基也可包含其它生长因子,如血小板源生长因子AB(PDGF AB)。本领域中已知这两种生长因子。方法可包括在包括FGF2和PDGF AB的培养基中培养细胞。

[0313] 可替代的或此外,培养基可包含或进一步包含表皮生长因子(EGF)。EGF的使用可增加MSC的生长。EGF可在的任何合适浓度下使用,如5-10ng/ml的EGF。EGF可代替PDGF使用。EGF是本领域中公知的蛋白质,并指符号EGF, A1t. 符号URG, Entrez1950, HUG03229, OMIM131530, RefSeq NM\_001963, UniProt P01133。

[0314] 这样,本发明人公开了包含(i)FGF2、(ii)FGF2和PDGF和(iii)FGF2和EGF与其它组合的培养基的使用。

[0315] FGF2是一种广谱促有丝分裂、血管生成和神经营养因子,其在许多组织和细胞类型中低水平表达,在大脑和垂体中达到高浓度。FGF2涉及众多的生理和病理过程,包括肢体发育、血管形成、伤口愈合和肿瘤生长。FGF2可从如Invitrogen-Gibco(Grand Island, New York)中购得。

[0316] 血小板衍生的生长因子(PDGF)是包括成纤维细胞、平滑肌和结缔组织的广泛细胞类型的强效促细胞分裂素。PDGF由称为A链和B链的两个链的二聚体组成,能以AA或BB同型二聚体或以AB异型二聚体呈现。人类PDGF-AB是由13.3kDa A链和12.2kDa的B链组成的25.5kDa的同源二聚体蛋白质。PDGF AB可从Peprotech(Rocky Hill, New Jersey)购得。

[0317] 生长因子,如FGF2和任选地PDGF AB,可以大约100pg/ml,例如约500pg/ml、例如约1ng/ml、例如约2ng/ml、例如约3ng/ml、例如约4ng/ml、例如约5ng/ml的浓度存在于培养基中。在一些实施方式中,培养基包含约5ng/ml的FGF2。培养基还可包含例如大约5ng/ml的PDGF AB。

[0318] 分离细胞(Splitting cells)

[0319] 培养物中的细胞通常持续生长直到汇合,当接触抑制导致细胞分裂和生长停止时。然后从基质或培养瓶分散这样细胞,并“分离”,通过稀释到组织培养基中和再铺板进入继代培养或传代。

[0320] 因此,本文所述方法和组合物可包括培养过程中的传代或分离。细胞培养物中的细胞可以1:2或更高,例如1:3,例如1:4、1:5或更高的比率分离。术语“传代”指包含下述步骤的过程:取细胞系融合培养物的等份,接种到新鲜培养基中,并培养细胞系直到达到融合或饱和。

[0321] 选择、筛选或分类步骤

[0322] 方法可进一步包括选择或分类步骤,以进一步分离或选择间充质干细胞。

[0323] 选择或分类步骤可包括通过一种或多种表面抗原标记从细胞培养物中选择间充质干细胞(MSC)。使用选择和分类步骤进一步增强了特异于MSC分类和选择的严谨性,此外,潜在降低了来自胚胎肝细胞的可能污染,胚胎干细胞如hESC和来自起始材料的其它hESC-

衍生物。然后,这将进一步减小畸胎瘤形成的风险,并进一步提高本发明人描述的方案的临床可靠性。

[0324] 已知基于抗原表达的大量选择或分类方法,且任意这些方法均可用于本文所述的选择或分类步骤。通过荧光活化细胞分选术(FACS)可实现选择或分类。因此,如本领域中已知的,FACS涉及暴露细胞给报告分子,如结合并标记被细胞表达的抗原的标记抗体。本领域中已知产生抗体方法或标记它以形成报告分子的方法,并在例如Harlow和Lane中有描述。然后,细胞通过FACS机器,其根据标记将细胞彼此分类。替代地或此外,可使用磁珠细胞分选法(MACS)将细胞分类。

[0325] 本发明人已经意识到,尽管许多候选表面抗原已知与MSC相关,例如CD105、CD73、ANPEP、ITGA4(CD49d)、PDGFRA,一些MSC相关表面抗原,例如CD29和CD49e也在ES细胞中高表达,所述ES细胞例如hESC,且其表达可通过FACS分析进行证实。表面抗原与MSC的相关性可能不足以定性所述抗原为用于从例如hESC的ES细胞中分离MSC的选择标签。因此,选择或分类步骤可使用在MSC和ES细胞间差异表达的抗原。

[0326] 本发明人的方法的选择和分类步骤可根据抗原表达阳性选择间充质干细胞。可例如通过比较hESC和hESCMSC的基因表达谱识别这样的抗原。在具体的实施方式中,选择或分类可特别地使用如下表E1A和E1B中所示的任何一种抗原。

[0327] 本发明人方法的选择和分类步骤可根据识别为在MSC上表达而不在例如hESC的ES细胞上表达的抗原的表达对间充质干细胞进行阳性选择。

[0328] CD73在MSC上高表达,而在hESC上不高表达。CD73和CD105都是在MSC上高表达的表面抗原,且是位列相对于hESC的hESC-MSC中前20高表达的表面抗原,CD73或CD105任一种(或二者)作为假定的MSC选择标记,在分类通过分化hESC产生的假定MSC中同等有效。

[0329] 替代地或此外,选择或分类步骤可根据在如hESC的胚胎干细胞(ES细胞)上而不在例如hESC-MSC的间充质干细胞上高表达为表面抗原的表面抗原阴性选择抗原。选择或分类步骤可基于已知的或以前鉴定的如MIBP、ITGB1BP3和PODXL和CD24的hESC-特异的表面抗原。

[0330] FACS分析证实了CD24在hESC而不在hESC-MSC上的表达。因此,CD24自身可用作阴性选择或分类标记,或与CD105组合用作用于从分化的hESC培养物分离假定的MSC的阳向选择标记。

[0331] 实施例

[0332] 实施例1.材料和方法—制备外来体外来体

[0333] 如先前所述,使用HPLC从huES9.E1衍生的MSC条件培养物(CM)纯化外来体外来体。简言之,使用具有100kDa MWC0(Sartorius,Goettingen,德国)的膜通过切向流过滤(TFF)将从MSC培养物中收集的CM浓缩50倍。

[0334] 然后,CM通过层析柱(TSK Guard柱SWXL,6x40mm和TSK凝胶G4000SWXL,7.8×300mm,Tosoh Corp.,Tokyo,日本)。

[0335] 从洗脱的第一个峰值中收集外来体外来体,用100kDa MWC0过滤器(Sartorius)浓缩。在储存或使用前用0.22μm过滤器过滤外来体外来体。

[0336] 实施例2.材料和方法——LC MS/MS

[0337] 如所述(20),在2ml透析外来体外来体中的蛋白质被还原、烷基化和胰蛋白酶消

化。

[0338] 然后,通过将消化混合物通过条件化的Sep-Pak C-18SPE试剂盒(Waters, Milford, MA, 美国)使样品脱盐,用3%乙腈(ACN)(新JT Baker, Phillipsburg, NJ)和0.1%甲酸(FA)缓冲液洗两次,并用70%的ACN和0.1%FA缓冲液洗脱。

[0339] 然后,通过在真空离心机中去除有机溶剂,将洗脱样品干燥至它们初始体积的大约10%。

[0340] 为降低样品复杂性,通过Polysulfoethyl SCX柱(200mm×4.6mm)(PolyLC, 美国)用HPLC系统(Shimadzu, 日本)进行离线肽分馏。

[0341] 1ml/min,流动相A(5mM KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>+30%乙腈)和流动相B(5mM KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>+30%乙腈+350mM KCl)。

[0342] 在真空离心机中收集和干燥成8个组分。

[0343] 分馏的样品装入在线连接至装备纳米喷雾源的LTQ-FT超线性离子阱质谱仪(Thermo Electron, Bremen, 德国)的Shimadzu微HPLC系统的自动上样器。

[0344] 在Zorvax300SB-C18浓缩柱(5mm×03mm, Agilent Technologies, 德国)中捕获注入的肽并脱盐,并洗脱到纳米钻孔的C18填充柱(75μm×100Å, Michrom Bioresources, Auburn, CA)中。

[0345] 使用分离器以恒定流速20 l/min到有效流速200nl/min的90分钟梯度,洗脱肽到质谱仪中。

[0346] 以数据依赖模、通过进行FTMS中来自每个MS扫描的最强烈的峰中的八个峰的MS/MS扫描来操作LTQ。

[0347] 对于每个实验,都通过一个自己编写的程序把8个SCX组分的MS/MS(dta)谱合并成一个单一的mascot通用文件。

[0348] 蛋白质鉴定通过内部的Mascot服务器(版本2.2.04, Matrix Science, 英国)在IPI人类蛋白质数据库(版本3.34;69,164条序列,29,064,825个残基)中搜索合并后的数据获得。

[0349] 搜索参数是:使用胰蛋白酶的2个错过的分裂的最大值;固定的修饰是半胱氨酸的氨甲酰甲基化修饰),并且可变修饰是蛋氨酸的氧化。

[0350] 肽前体和片段离子的质量公差分别设为10ppm和0.8Da。

[0351] 如果发现两个不同的肽具有高于同源性得分的得分,蛋白质鉴定接受为真阳性。

[0352] 实施例3.材料和方法——抗体芯片

[0353] 根据制造商的说明,使用基于RayBio®生物素标记的人类抗体芯片I(RayBio, Norcross, GA)检测来自三个独立制品的500 l非条件培养物和外来体外来体的细胞因子和其它蛋白的存在。

[0354] 如果信号强度比非条件培养物高2倍(p<0.05),认为外来体外来体中存在细胞因子和其它蛋白。

[0355] 实施例4.材料和方法——Western印迹杂交

[0356] 在4~12%的SDS聚丙烯酰胺凝胶上分离12μg外来体外来体,并电转染到硝酸纤维素膜上。

[0357] 转移膜到SNAP i.d.系统(Millipore, Billerica, CA)的膜支架上,封闭并用抗人

一抗培养,抗人一抗包括小鼠抗GAPDH(1:100稀释)、小鼠抗PGK(1:60)、小鼠抗PGD(1:60)、兔抗PFKFB3(1:60)、小鼠抗丙酮酸激酶(PK,1:200)、小鼠抗20S蛋白酶体 $\alpha$ 1-7(1:200)、小鼠抗CD73(1:60)和小鼠抗CD59(1:200)。

[0358] 然后,用辣根过氧化物酶偶联的二抗温育印迹。

[0359] 所用的第二抗体是山羊抗小鼠IgG(1:1250)或驴抗兔IgG(1:1250)。

[0360] 所有抗体,除了鼠抗PK获得自Abcam Inc.,Cambridge,MA之外,均获得自Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA。

[0361] 然后印迹与HRP增强化学发光底物(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA)孵育并然后暴露于X射线胶片。

[0362] 实施例5.材料与方法-酶分析-丙酮酸激酶分析

[0363] 5 $\mu$ g外来体(在12 $\mu$ l中)被使用细胞提取试剂盒(Biovision,Mountain view,CA)裂解。

[0364] 所裂解的外来体提取物与50 $\mu$ l市售的PK分析试剂盒(Biovision)中的反应混合物孵育。

[0365] 在该分析中,由PK产生的丙酮酸由丙酮酸氧化酶氧化以产生荧光(Ex/Em=535/587nm)。

[0366] 因此,荧光强度的升高与所产生的丙酮酸的量成比例。

[0367] 实施例6.材料与方法-酶分析-GAPDH和PGK分析

[0368] GAPDH和PGK活性基于它们在糖酵解反应中的下游产物ATP进行检测,使用2个市售的试剂盒,KDAlert GAPDH分析试剂盒(Ambion Inc.,Austin,TX)和ApoSENSORADP/ATP比例分析试剂盒(Biovision)。

[0369] 简要地,外来体使用细胞提取试剂盒(Biovision)裂解。

[0370] 为了检测GAPDH活性,10 $\mu$ g裂解的外来体加至含有D-甘油醛-3-磷酸、NAD<sup>+</sup>和Pi的KDAlert反应缓冲液以形成1,3-二磷酸甘油酸酯+NADH+H<sup>+</sup>。

[0371] 然后,250U/ml PGK和60 $\mu$ M ADP加入以转换1,3-二磷酸甘油酸酯和ADP为3-磷酸甘油酸酯和ATP。

[0372] 所产生的ATP的量与GAPDH活性成比例,然后使用ATP荧光素酶分析来检测。

[0373] 为了检测PGK活性,10 $\mu$ g裂解的外来体加至上述分析中产生的1,3-二磷酸甘油酸酯。

[0374] 加入ADP以允许形成ATP。

[0375] ATP的量与PGK活性成比例,然后使用ATP荧光素酶分析来定量。

[0376] 实施例7.材料与方法-酶分析-20S蛋白酶体分析

[0377] 蛋白酶体活性采用20S蛋白酶体活性分析试剂盒(Millipore)进行测定,基于在存在或不存在特异性20S蛋白酶体抑制剂乳胞素情况下,由20S蛋白酶体裂解标记的底物LLVY-AMC后对荧光基团7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)的检测。

[0378] 简要地,4 $\mu$ g外来体于含有LLVY-AMC、在存在或不存在25 $\mu$ M乳胞素的反应缓冲液中孵育。

[0379] 样品和AMC标准品于37 $^{\circ}$ C孵育,并监测于Ex/Em=380/460nm处的荧光强度2小时。

[0380] 实施例8.材料与方法-酶分析-CD73分析

- [0381] 外来体中CD73(NT5E)的酶活通过将2.5 $\mu$ g外来体于100 $\mu$ l含有50 $\mu$ M AMP(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)的pH7.4的Tris缓冲液中孵育确定。
- [0382] 然后,AMP水解释放的磷酸根离子的量通过Colorlock Gold试剂盒(Innova Biosciences, Cambridge, 英国)按照制造商的说明书进行确定。
- [0383] 实施例9. 材料与方法-细胞分析-糖酵解
- [0384] H9C2心肌细胞以每孔30,000细胞接种于96孔板(包被聚赖氨酸)。
- [0385] 5小时后,在包含20 $\mu$ mol寡霉素(Sigma-Aldrich)、6mmol葡萄糖,并在有或者没有0.1 $\mu$ g/ml外来体存在下孵育15、30和60分钟之前,细胞用台氏缓冲液洗涤两次。
- [0386] 细胞ATP浓度采用ATPlite一步荧光ATP检测分析系统(PerkinElmer, Zaventem, 比利时)检测。
- [0387] 实施例10. 材料与方法-细胞分析-腺苷酸介导的信号转导
- [0388] H9C2心肌细胞以每孔200,000细胞接种到6孔板并血清饥饿过夜。
- [0389] 然后在有或没有1mM茶碱(theophylline)存在下孵育细胞另一小时。
- [0390] 同时,准备两个系列的无血清培养基。
- [0391] 一个系列未包含添加,单独50 $\mu$ M AMP,单独0.1 $\mu$ g/mL外来体或50 $\mu$ M AMP和0.1 $\mu$ g/mL外来体的组合。
- [0392] 第二个系列与第一个相似,除了培养基包含1mM茶碱。
- [0393] 两个系列在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。
- [0394] 第一个系列用于替换在无血清培养基中单独培养的细胞的培养物,第二个系列是对那些在包含茶碱的培养基中培养的细胞。
- [0395] 五分钟后,收集细胞并使用市售的哺乳动物细胞提取试剂盒(BioVision)在存在蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物1(Sigma Aldrich)下裂解。
- [0396] 蛋白浓度通过标准Bradford分析确定。
- [0397] 10 $\mu$ g总蛋白采用1:2000稀释的兔抗-pERK1/2(Cell Signaling, 9101S)、1:2000稀释兔抗p-AKT(Cell Signaling, 9271S)、1:500稀释的兔抗ERK1(Santa Cruz, sc-94)和1:500稀释兔抗AKT(Cell Signaling, 9272S)通过Western印迹杂交进行分析。
- [0398] 实施例11. 材料与方法-细胞分析-补体介导的细胞裂解
- [0399] 简要地,购买绵羊红细胞(SRBC)(Innovative Research, Southfield, MI)并用磷酸盐缓冲液(PBS)在以 $1 \times 10^8$ 细胞/ml PBS重悬之前洗涤三次。
- [0400] 纯化的补体组分C5b6、C8和C9购自Calbiochem(San Diego, CA),以及C7购自Sigma-Aldrich(St Louis, MO)。
- [0401] 在SRBC上完整的C5b-9的装配起始于与1ml每种C5b6(0.1 $\mu$ g/ml)和C7(0.4 $\mu$ g/ml)在存在或不存在终浓度0.1 $\mu$ g/ml的外来体情况下孵育15min(37 $^{\circ}$ C)。
- [0402] 然后,洗涤SRBC并与1ml每种C8(0.4 $\mu$ g/ml,)加C9(0.4 $\mu$ g/ml)在有或者没有终浓度0.05 $\mu$ g/ml封闭CD59抗体的情况下额外孵育30min。
- [0403] 之后,离心SRBC并且上清中由裂解的SRBC释放的血红蛋白的量由415nm处的吸光度测定。
- [0404] 用1%(w/v)Triton X-100处理细胞得到全部(100%)溶血。
- [0405] 实施例12. 结果-外来体的蛋白质组学谱



[0406] 外来体从HuES9.E1条件化的培养基中纯化,HuES9.E1是由先前所述的HPLC<sup>9,10</sup>的人类ESC衍生的间充质干细胞<sup>13</sup>。使用质谱和抗体方法的蛋白质组学谱如先前所述<sup>9-11</sup>在3个独立制备批次的HPLC纯化的外来体中进行。总共检测到866个蛋白并且这些蛋白基于它们的基因符号进行了注释以帮助分析(表E1)。这些中,发现739个蛋白中的318个基因产物先前在未分级的条件培养基中被鉴定了<sup>9,10</sup>(图1)。

[0407] 基于在从培养的细胞和生物学流体纯化的外来体所进行的15个蛋白质组学分析的数据分析,Thery等人已经观察到一系列大约17个蛋白,即甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、丙酮酸激酶(PK)、真核翻译延长因子1A1(EEF1A1)、乳脂肪球EGF因子8蛋白(MFGE8)、四跨膜蛋白、14-3-3蛋白、Gα蛋白、网格蛋白、Alix(PDCD6IP)、MHC1类、膜联蛋白(ANX)、Rab蛋白、埃兹蛋白(VIL2)、根蛋白(RDX)和膜突蛋白(MSN)(ERM)、肌动蛋白、微管蛋白,在鉴定的至少50%的外来体<sup>2</sup>中发现存在HSP70和HSP90。未出乎意料地,这些蛋白中的大部分也被发现在HPLC纯化的MSC外来体的蛋白酶体中(表E1)。还与外来体的核内体来源一致的是,本发明人检测了核内体相关蛋白例如Alix(PDCD6IP)和Rab的存在(表E1)。

[0408]

A2M	BSG	COMP	FBLN1	HMGCS2	KRT15	MMP2	PRR4	RPS4X	TGFB1
ABI3BP	C11orf59	COPB1	FBN1	HNRNPA1	KRT16	<u>MMP3</u>	PRSS23	RPS5	TGFB2
ACAA2	C1orf78	COPS3	FBN2	HP	KRT17	MOS	PSMA1	RPSA	TGEB1
ACAT2	C1R	COPS4	FBXW8	HPX	KRT18	MPO	PSMA2	RRAS2	TGM2
ACLY	C1S	COPS8	FEN1	HRSP12	KRT19	MPZL1	PSMA3	RTN4	TGOLN2
ACSL1	C20orf114	CPS1	FER1L3	<u>HSP90A2</u>	KRT2	MRC2	PSMA4	RUVBL1	THBS1
<u>ACTA1</u>	C3	CREG1	FGA	<u>HSP90A3</u>	KRT27	<u>M38</u>	PSMA5	S100A11	THBS2
<u>ACTA2</u>	C5orf24	CRIP1	FGB	<u>HSP90B1</u>	KRT28	<u>MSTN</u>	PSMA6	S100A13	THY1
<u>ACTB</u>	C9orf19	CRTAP	<u>FGF16</u>	<u>HSP41A</u>	KRT3	MXRA5	PSMA7	<u>S100A8</u>	<u>TIMP1</u>
<u>ACTG2</u>	C9orf91	CSF1	<u>FGF18</u>	<u>HSP41B</u>	KRT4	MYADM	PSMB1	<u>S100A9</u>	<u>TIMP2</u>

[0409]

ACTN1	CACNA2D1	<u>CSF2</u>	<u>FGF19</u>	<u>HSP47</u>	KRT5	MYCBP AP	PSMB10	S100P	<u>TIMP3</u>
ACTN2	CACNA2D4	<u>CSE3</u>	<u>FGFRL1</u>	<u>HSP46</u>	KRT6A	MYH14	PSMB2	SAA4	TKT
ACTN3	CALR	CSPG4	FGG	<u>HSP47</u>	KRT6B	MYH9	PSMB3	SASS6	TLN1
ACTN4	CAND1	CST4	FLG2	HSPB1	KRT6C	MYL6B	PSMB4	SCAMP3	TMBIM1
ACTR1 A	CAP1	CTA-221 G9.4	FLJ1319 7	HSPD1	KRT7	MYO1C	PSMB5	SCGB2A 1	TMEDI0
ACTR2	CAPNS1	CTBP2	FLJ2218 4	HSPG2	KRT72	<u>NBL1</u>	PSMB6	<u>SCYE1</u>	TMED9
ACTR3	CAPZA1	CTNNA1	FLJ3278 4	HTRA1	KRT73	NEFH	PSMB7	SDC1	TMEM16B
ADAM1 0	CASP14	CTNNA2	FLNA	HY1	KRT74	NEK10	PSMB8	SDC2	TMEM2
ADAM9	CAT	CTNNB1	FLNB	ICAM1	KRT76	NID1	PSMB9	SDC4	TMEM47
ADAM TS12	CAV1	CTNND1	FLNC	<u>ICAM5</u>	KRT77	NLRP8	PSMC5	SDCBP	TMEM51
AEBP1	CCDC129	CTSG	FLOT1	IDH3B	KRT78	NME1	PSMD11	SEFC14L4	TNC
AFM	CCDC64B	<u>CXCL16</u>	FLOT2	IFITM2	KRT79	NOMO1	PSMD14	SEMA5 A	<u>TNFRSF11</u> <u>B</u>
AGRN	<u>CCL20</u>	<u>CXCL2</u>	FLT1	<u>IFNG</u>	KRT8	NRAS	PSMD6	SEPT2	<u>TNFRSF12</u> <u>A</u>
AHCY	<u>CCL28</u>	CXorf39	FN1	IFRD1	KRT80	<u>NRG2</u>	PSMD7	SEPT7	<u>TNFRSF1</u> <u>A</u>
AHNAK 2	<u>CCL7</u>	CYBRD1	FREM3	IFT140	KRT84	NRP1	PTGFRN	SERINC 5	TNFSF18
AHSG	<u>CCR4</u>	DBF4B	FST	<u>IGF2R</u>	KRT9	NT5E	PTK7	SERPIN A1	TPBG
AKR1B 1	<u>CCR5</u>	DCD	FTL	<u>IGFBP3</u>	LACRT	<u>NTF4</u>	PTRK	SERPIN B3	TPI1
AKR7A 2	CCT5	DCHS2	FUCA2	<u>IGFBP4</u>	LAMA4	NUSAP1	PTRF	SERPIN E1	TRAP1
ALB	CCT6A	DCLK2	GALNT5	<u>IGFBP6</u>	LAMB1	OBFC1	PTTG1IP	SERPIN E2	<u>TREM1</u>
<u>ALCAM</u>	CD109	DCN	GANAB	IGFBP7	LAMC1	ODZ3	PTX3	SERPIN F1	TREML2P
ALDH2	CD151	DCTN1	<u>IGFBP8</u>	IGHA1	LAMP1	OFD1	PXDN	SFN	TRIM40

[0410]

ALDH3 A2	CD248	DECR1	GAPDH S	IGHA2	LAMP2	OPRM1	PZP	SFRP1	TRIM41
ALDH6 A1	CD276	DEFA1	GARS	IGHG1	LAP3	<u>OSM</u>	QPCTL	<u>SFRP4</u>	TSN
ALDH7 A1	<u>CD40LG</u>	DIP2B	GAS6	IGHG2	LCN1	OTC	QSOX1	SHANK3	TSNAX
ALDH9 A1	CD44	DIRAS2	<u>GDF1</u>	IGHG4	LCN2	OXNAD 1	<del>RAB10</del>	SLAIN1	TSPAN14
ALDOA	CD47	DKFZp6 86D0972	<u>GDF11</u>	IGHM	LDHA	OXTR	<del>PAB1B</del>	SLC16A 1	TSPAN4
ALDOB	CD59	<u>DKK1</u>	<u>GDF15</u>	IGJ	LDHAL6 B	P4HB	<del>RAB14</del>	SLC16A 3	TSPAN6
ALDOC	<del>CD63</del>	<u>DKK3</u>	<u>GDF3</u>	IGKC	LDHB	PAICS	<del>RAB15</del>	SLC1A4	TSPAN9
ALOX1 2P2	<del>CD64</del>	DMBT1	<u>GDF5</u>	IGKV1-5	LEPRE1	PAN3	<del>RAB1A</del>	SLC1A5	TSTA3
AMH	CD82	DNASE1 L1	<u>GDF9</u>	IGL@	LGALS1	PAPPA	<del>RAB1B</del>	SLC22A 2	TTLL3
ANG	<del>CD89</del>	DNPEP	GDI1	IGLV4-3	<u>LGALS3</u>	PARP10	<del>RAB2A</del>	SLC25A 10	TTN
<u>ANGPT</u> <u>L2</u>	CDC2L5	DPYS	GDI2	IGSF8	BP	PARP16	<del>RAB33B</del>	SLC25A 13	TTYH3
<u>ANGPT</u> <u>L4</u>	CDC42	DPYSL2	<u>GFRA3</u>	<u>IL10</u>	LGALS8	PARVG	<del>RAB35</del>	SLC2A1	<del>TUBA1A</del>
ANPEP	CDH13	DSP	GLDC	<u>IL11</u>	LGR6	PC	<del>RAB39B</del>	SLC2A3	<del>TUBA1B</del>
<del>ANXA1</del>	CDIPT	DULLA RD	GLUD1	<u>IL13</u>	<u>LIF</u>	PCOLCE	<del>RAB3A</del>	SLC38A 2	<del>TUBA1C</del>
<del>ANXA1</del> 1	CDK5R2	ECM1	<del>GNAI3</del>	<u>IL15RA</u>	LMNA	PDCD6	<del>RAB7B</del>	SLC38A 3	<del>TUBB</del>
<del>ANXA2</del>	CEACAM8	EDA	GNAI2	IL17B	LOC124 220	<del>PDCD6I</del> P	<del>RAB7C</del>	SLC39A 14	<del>TUBB2A</del>
<del>ANXA2</del> F1	CFB	EDG2	GNAL	<u>IL17RA</u>	LOC283 523	<u>PDGFA</u>	<del>RAB6A</del>	SLC3A2	<del>TUBB7C</del>
<del>ANXA3</del>	CFI	EDIL3	GNAS	<u>IL19</u>	LOC284 297	<u>PDGFC</u>	<del>RAB7A</del>	SLC44A 1	<del>TUBB3</del>
<del>ANXA4</del>	CFL1	EEA1	GNAI3	<u>IL1F9</u>	LOC388 344	PDGFRB	<del>RAB8A</del>	SLC44A 2	<del>TUBB4</del>
<del>ANXA5</del>	CFL2	<del>EEF1A1</del>	GNB1	<u>IL1RAP</u>	LOC389	PDIA3	<del>RAB8B</del>	SLC7A1	UBA52

[0411]

					827			0	
AP3A6	CFTR	EEF1G	GNB2	IL1RAPL1	LOC442497	PEBP1	RAC1	SLC7A5	UBB
AP3A7	CHMP2A	EEF2	GNB4	IL1RL2	LOC653269	PFAS	RAC2	SMAD4	UBE1
AP1S1	CHRD1	EFEMP2	GNG12	IL22RA1	LOC727942	PFKFB3	RAD21	SMARCA4	UBE2N
APEH	CHST12	EHD1	GNPDA1	IL23A	LOC728320	PFN1	RALA	SMC1A	UGP2
APOA1	CITED1	EHD2	GOT2	IL3	LOC728378	PFN2	RAN	SORT1	UNC13B
APOE	CLASP2	EHD4	GPC1	IL5	LOC730013	PGAM2	RAP1A	SOS1	UNC45A
APP	CLDN1	EIF4A1	GPC5	IL6	LOXL2	PGD	RAP1B	SPACA1	VAMP3
ARF1	CLEC11A	EMILIN1	GPI	IL6ST	LRP1	PGK1	RAP1B	SPARC	VANGL1
ARF4	CLIC1	ENC1	GPR112	IL7	LRP6	PGLYRP2	RAP2C	SFOCK1	VASN
ARF5	CLIC6	ENG	GREM1	IL8	LRRFIP2	PIGR	RARRES1	SPRY4	VATI
ARHGA18	CLPX	ENO1	GRM2	INHBA	LTBP1	PIP	RASA1	SPTAN1	VCAN
ARHGA23	CLSTN1	ENO2	GRM3	INHBB	LTBP2	PITX3	RASA4	SPTBN1	VCL
ARHGD1A	CLTA	ENO3	GRM7	INSR	LTF	PLM2	RB1CC1	SPTBN4	VCP
ARHGE1	CLTC	ENTPD4	GSN	IQGAP1	LYAR	PLAU	RCOR2	SRGN	VEGFC
ARL6IP5	CLJCE1	EPB41L3	GSTM1	ITGA11	LYZ	PLEC1	RDH5	SRI	VIL1
ARMS2	CLU	EPHA2	GSTM2	ITGA2	MAMDC2	PLEKHG3	RFTN1	SRPX2	VHL2
ARPC3	CMIP	EPO	GSTM5	ITGA3	MAP1A	PLOD1	RGX	ST6GALNAC6	VIM
ARPC4	CNGB1	EPX	GSTO1	ITGA4	MAP2K6	PLOD2	RHOC	STAT1	VTG1A
ARPC5	CNOT6	ESM1	GSTP1	ITGA5	MAP3K1	PLOD3	RMND5A	STC1	VTN

[0412]

ASH1L	<u>CNTN1</u>	ETFB	GTPBP2	<u>ITGAL</u>	MARCK S	PLP2	RNF123	STC2	WDR49
ASL	COL12A1	F2R	<u>GYLTL1</u> B	ITGAV	MARCK SL1	PLSCR3	RNF40	STOM	WDR52
ATP1A1	COL14A1	F3	<u>GZMA</u>	ITGB1	MAT1A	PLTP	RPL10A	STOML3	WNT5A
ATP1B3	COL18A1	F8	H2AFV	ITGB5	MBD3	PLUNC	RPL12	STX12	YBX1
ATP2B1	COL1A1	<u>FADD</u>	H2AFX	ITIH2	MCC	PNO1	RPL15	STX2	<b>YWHA4</b>
ATP2B4	COL1A2	FAH	HBB	ITIH4	MCM10	PODN	RPL18	SURF4	<b>YWHA4</b>
ATP5A1	COL2A1	FAM108 A1	HBE1	ITPR2	MDH1	POLN	RPL23	SVEP1	<b>YWHA4</b>
ATP5B	COL3A1	FAM129 B	HDAC5	JUP	MDH2	POSTN	RPL29	SYT1	<b>YWHA9</b>
ATP8B3	COL4A1	FAM29A	HHERC5	KIAA0146	ME1	POTE2	RPL35A	SYT9	<b>YWHA2</b>
ATRN	COL4A2	<u>FAM3B</u>	<u>HGF</u>	KIAA0256	MECP2	PPIA	RPLP0	TAAR2	ZBTB4
ATXN1	COL4A3	FAM64A	HISPPD2 A	KIAA0467	<u>MET</u>	PPIB	RPS10	TAGLN	ZNF134
AXL	COL5A1	FAM71F 1	HIST1H2 AE	KIAA1881	MFAP4	PPME1	RPS16	TALDO1	ZNF503
BASP1	COL5A2	FAP	HIST1H2 BA	KPNB1	<b>MFGE8</b>	PPP1CC	RPS18	TAS2R6 0	ZNF614
<u>BDNF</u>	COL6A1	FASN	HIST1H2 BL	KRT1	MFSD2	PRDM16	RPS2	TCN1	
BGN	COL6A2	FAT	HIST1H4 H	KRT10	<u>MIF</u>	PRDX1	RPS24	TF	
BIHMT2	COL6A3	FAT2	HIST2H2 BE	KRT13	<u>MMP1</u>	PRDX6	RPS27A	TFG	
BRMS1	COL7A1	FAT4	<b>HEA4</b>	KRT14	<u>MMP10</u>	PRNP	RPS3	TFRC	

[0413] 表E1:由LC MS/MS和抗体芯片确定的3个独立制备的外来体的蛋白质组学谱。黑体字-由LC MS/MS鉴定。下划线-由抗体芯片鉴定。灰色阴影-由LC MS/MS鉴定并在鉴定的至少50%的外来体<sup>2</sup>中发现存在。

[0414] 实施例13.结果-外来体蛋白蛋白质组的计算分析

[0415] 为了更好地理解外来体中蛋白质的生物学意义,866个蛋白在生物过程中的功能性群集使用PANTHER(Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships,通过进化关系的蛋白分析)分析软件<sup>14,15</sup>进行。从每个生物过程中外来体蛋白质组所观察到的基因频率与NCBI数据库相应生物过程的基因的参考频率进行比较。866个基因产物可以归集于32个过度代表(over-represented)的生物过程(p<0.001)和3个未被充分代表(under-

represented)的生物过程( $p < 0.001$ )(图2)。

[0416] 这些生物过程可以进一步归类为与外来体生物学有关的几种活动,例如,通讯、细胞运动性、炎症和外来体生物发生(biogenesis)。由于外来体的功能通常被假定作为细胞内通讯和形态发生素信号转导<sup>4,16</sup>和免疫活性的介质<sup>2</sup>的载体,外来体蛋白在信号转导通路、细胞结构、细胞运动性和免疫反应中的涉及并非未预期到的。本发明人暂时称为“外来体生物发生”的第四类过程实质上反映外来体的生物发生和释放,其通过涉及核内体、ESCRT介导的分选和多泡体的形成以及与质膜的融合。因此,例如转高尔基网络、细胞内蛋白运输(traffic)、普通囊泡转运、胞吞作用、受体介导的胞吞作用、其它蛋白靶向和定位以及胞吐作用中涉及的那些蛋白质并非未预期到富集于外来体中。本发明人分类为组织修复和再生的其它生物过程包括涉及包括骨骼发育和血管形成的中胚层和外胚层组织的发育和分化的那些生物过程。这些生物过程与间充质干细胞的分化潜力一致<sup>17</sup>并反映外来体的细胞起源。在本发明人的代谢分类中,本发明人包括涉及产生能量的分解代谢或合成代谢及为生长和再生提供基础材料的过程。血液凝固也是重要的本发明人假定的过度代表的生物过程,其在改善组织损伤中可能是重要的。所有三个未被充分代表的生物过程并未不可预料地涉及在转录水平调节基因表达。在这些过程中涉及的大部分蛋白倾向于有效转运至细胞核,使得它们好像与外来体更少相关。本发明人还观察到,发现于条件培养物(CM)中的421个蛋白并未存在于外来体中(图1),并且这些蛋白可功能性归集于十一个过度代表和两个未被充分代表的生物过程。在过度代表的生物过程中,六个还被发现归集在外来体中发现的866个蛋白中,而剩下的五个,即氨基酸活化、蛋白折叠、染色体包装和重塑、蛋白复合体装配和mRNA剪接没有被发现。两个未被充分代表的生物过程还被发现是未被充分代表的外来体蛋白。MSC外来体中的蛋白种种阵列意味着它们有潜力参与广谱生化和细胞活性。为了检测这个假设,本发明人选择可以分析检测它们的生化和细胞活性并且其总和提供外来体活性的广谱多样性的指示的那些蛋白。

[0417] 实施例14. 结果-外来体通过糖酵解增强的细胞ATP产生

[0418] 外来体蛋白质组的一个显著特征是存在糖酵解的ATP产生阶段的所有五种酶(图3A):甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、磷酸甘油酸激酶(PGK)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM)、烯醇化酶(ENO)和丙酮酸激酶m2亚型(PKm2)。这些之中,产生ATP或NADH的三种酶,即GAPDH、PGK和PKm2还被免疫印迹证实存在(图3B)。它们的酶活性分别被确定为每 $\mu\text{g}$ 蛋白1.1 $\mu\text{U}$ 、3.59 $\mu\text{U}$ 和5.5 $\mu\text{U}$ (图3C),其中1单位(U)酶活性定义为每分钟生成1微摩尔产物所需的活性。

[0419] 此外,外来体包含转换果糖6-磷酸为果糖2,6-二磷酸的PFKFB3。PFKFB3是由四个不同基因PFKFB1、2、3和4编码的四种PFKFB亚型之一。PFKFB负责维持果糖2,6-二磷酸的细胞水平,其为催化糖酵解定型的磷酸果糖激酶<sup>18</sup>的强有力的变构激活子。它们被认为对高糖酵解速率或癌症细胞中的“Warburg作用”<sup>19</sup>负责。PFKFB3的激酶活性由蛋白激酶,例如cAMP依赖的蛋白激酶和蛋白激酶C的磷酸化上调。质谱分析显示外来体中PFKFB3的存在并且免疫印迹进一步证实该酶是磷酸化的(图3A)。

[0420] 外来体中产生ATP的糖酵解酶和磷酸化的PFKFB3的存在预示,将细胞暴露于外来体可以提高糖酵解流出和提高ATP产量。为了检测这一点,本发明人测定了这些外来体是否可以在寡霉素处理的H9C2细胞中提高ATP合成。由于寡霉素抑制线粒体ATP酶<sup>20</sup>,寡霉素处理的细胞会不得不利用糖酵解作为它们细胞ATP的主要来源。与存在糖酵解酶和PFKFB3一致,

以及本发明人先前证实H9C2细胞能内在化MSC外来体<sup>12</sup>,在暴露于外来体15至30分钟时,外来体通过提高的糖酵解分别提高寡霉素处理的细胞的ATP水平75.5+28.8%或55.8+16.5%。

[0421] 实施例15.外来体中的20S蛋白酶体是酶活性的

[0422] MSC外来体的质谱分析不仅检测到20S核心颗粒的所有七种 $\alpha$ -(PMSA1-7)和所有七种 $\beta$ -亚基(PMSB1-7)的存在,还检测到“免疫蛋白酶体”的三种 $\beta$ 亚基,PMSB8( $\beta$ 5i或LMP7)、PMSB9( $\beta$ 1i或LMP2)、PMSB10( $\beta$ 2i或LMP10)基因产物<sup>21</sup>。一些20S蛋白酶体肽的存在进一步由Western印迹杂交证实(图4A)。20S核心颗粒的所有七种 $\alpha$ -(PMSA1-7)和所有七种 $\beta$ -亚基(PMSB1-7)的存在意味着MSC外来体包含完整的20S蛋白酶体复合体,并因此潜在地具有20S蛋白酶体酶活性。

[0423] 与此一致的,MSC外来体能够以5.00 $\mu$ U/ $\mu$ g蛋白的酶活降解短荧光肽并且这种降解被乳胞素,一种蛋白酶体抑制剂,抑制(图4B)。本发明人还观察到与上述糖酵解酶分析不一样,外来体中20S蛋白酶体活性可不通过裂解外来体被检测到。这意味着20S蛋白酶体可能存在于外来体的表面而不是内腔。

[0424] 先前观察到20S蛋白酶体优选以“在端点”(“end-on”)的构型装配于磷脂酰肌醇脂单层、ER和高尔基脂质膜<sup>22</sup>上,以致20S蛋白酶体的进入是垂直于膜的。因此,这个与本发明人的观察一起表明,外来体中的20S蛋白酶体附着于外膜表面并且它们的进入是垂直于外来体膜的。

[0425] 实施例16.结果-外来体通过NT5E(CD73)外生-5'-外核苷酸酶磷酸化ERK和AKT

[0426] 外生-5'-外核苷酸酶(NT5E或CD73)与外生-三磷酸腺苷双磷酸酶(CD39)一起酶法转换前体核苷酸为腺苷。在细胞损伤过程中,细胞释放ATP和ADP<sup>23</sup>。CD39水解胞外ATP和ADP为AMP,然后其由外生-5'-外核苷酸酶降解为腺苷。

[0427] 在人类血液中腺苷具有十秒的半衰期。它是强有力的血管舒张剂,但没有用于临床作为血管舒张剂,因为它的作用非常短。它被用于超心室性心博过速的快速治疗。腺苷是内源性嘌呤核苷,其通过四种已知的腺苷受体亚型(A1、A2A、A2B和A3)调节许多生理过程<sup>24</sup>。

[0428] NT5E通过质谱分析发现并被免疫印迹证实存在于MSC外来体中(图5A)。它们的酶活性确定为22.04 $\mu$ U/ $\mu$ g蛋白。为了确定外来体是否能够通过CD73介导的AMP水解激活细胞中的腺苷信号转导,H9C2心肌细胞血清饥饿过夜,然后暴露于外来体和AMP。然后分析细胞裂解物的ERK1/2和AKT的磷酸化(图5B,图5C)。

[0429] 血清过夜饥饿之后,暴露于外来体和AMP诱导ERK1/2和AKT的磷酸化。ERK1/2和AKT的磷酸化被茶碱(一种非选择性腺苷受体拮抗剂,拮抗A1、A2A、A2B和A3受体)的存在所破坏。

[0430] 实施例17.结果-外来体抑制膜攻击复合物的形成

[0431] 补体系统是先天性免疫系统的一部分,其补充抗体的功能。一旦激活,生化级联反应被启动以产生几种关键产物:C3b,其结合到病原表面并增强对这些病原的吞噬作用;C5a,其通过趋化作用帮助招募炎性细胞;以及C5b,其启动由C5b、C6、C7、C8和多聚C9组成的MAC的形成。沉积于靶细胞上的MAC形成跨膜通道,其导致随后的细胞裂解。补体通路的异常激活被认为在心肌缺血再灌注损伤中起有害的作用<sup>26</sup>。

[0432] MSC外来体通过质谱分析发现含有CD59并且这被免疫印迹所证实(图6A)。因为CD59抑制MAC的形成<sup>27</sup>,这表明外来体可以抑制补体激活和随后的补体介导的细胞裂解。与

这个假设一致的是,外来体抑制补体介导的绵羊红细胞(SRBC)的裂解(图6B)。当CD59封闭抗体被用于预处理外来体时,该抑制被消除,这显示外来体的CD59直接涉及补体裂解的抑制。

[0433] 实施例18.讨论(对实施例1至17)

[0434] 在这个报道中,本发明人对3个独立制备的、HPLC纯化的ESC衍生的MSC外来体的蛋白质组采用质谱和细胞因子芯片进行描绘,并鉴定了866个蛋白质。这些蛋白包括通常在其它外来体中发现的许多蛋白。

[0435] 根据它们的功能归集这些蛋白显示,外来体具有驱动许多生物过程的潜力。为了评估这个设想的生物学潜力,本发明人检查了基于分析它们的生化和细胞活性是可用的所选择的一系列蛋白,并且作为一组,它们证明了活性的广泛多样性。更重要的是,这些所选择的蛋白的生化和细胞活性能够潜在地改良急性心肌缺血/再灌注损伤的组织损伤。

[0436] MSC外来体的蛋白质组包含各种各样的蛋白质。显著的部分是涉及通过生物合成和内吞途径高度调节和复杂的细胞内膜运输和分类<sup>28</sup>,并且这些蛋白的存在可能反映了外来体的生物发生,其实质上是许多细胞类型分泌的小脂双层膜囊泡。先前观察到,不同细胞来源的外来体携带一组共同的蛋白质,其中许多反映了它们的生物发生<sup>29</sup>。外来体的生物发生的复杂性和蛋白质和RNA货物装载的选择性装载显示细胞资源的沉重投入并且这种承诺(commitment)必须基于重要的生理功能。

[0437] 虽然外来体已经被发现超过30年了,外来体的生物学重要性才刚刚开始被揭示。它已经涉及越来越多的重要生理和病理过程,例如无用蛋白的去除<sup>1</sup>、抗原提呈<sup>30</sup>、遗传交换<sup>31</sup>、免疫反应<sup>32,33</sup>和肿瘤转移<sup>32-37</sup>。总之,这些观察表明,作为一个群体或个体,外来体可以调节许多生物过程。后者的可能性由外来体中已经发现的大量蛋白质和RNA支持<sup>12,38</sup>。除了上述所列的外来体的功能,本发明人最近还观察到,MSC分泌的外来体可以减少小鼠急性心肌缺血/再灌注损伤模型的梗死面积<sup>9</sup>。为了研究和阐明分子机制,本发明人进行了对MSC的外来体进行了系统的蛋白质组学研究,以揭示这些外来体的细胞和生化潜力,以及鉴定能够改良急性心肌缺血/再灌注损伤中的组织损伤的候选生物学活性<sup>9</sup>。

[0438] 本发明人首先确定了负责产生ATP和NADH的糖酵解酶<sup>18</sup>,其不仅存在于外来体中而且还是生化活性的。此外,外来体还包含催化果糖-2,6-二磷酸形成的PFKB3的活性磷酸化形式,其是磷酸果糖激酶的强有力的变构激活子。这些观察表明MSC外来体具有通过糖酵解恢复细胞ATP和NADH的潜力,独立于线粒体的功能。除了作为ATP产生的主要位点,线粒体也是调节细胞死亡的主要细胞器<sup>39</sup>。在病理情况下,如急性心肌缺血/再灌注损伤,线粒体功能损失和随后的ATP耗竭通常代表导致细胞死亡的级联反应的早期步骤。ATP缺乏,细胞活力的主要指标,是线粒体功能障碍的关键结果。由于MSC外来体可以被细胞内在化<sup>12</sup>,外来体具有通过提高糖酵解酶的细胞含量或带有线粒体损伤的细胞中磷酸化的PFKB3以恢复细胞ATP水平的潜力。实际上,当H9C2细胞中的线粒体ATP酶被寡霉素抑制时,外来体可以提高这些细胞中的ATP产量。

[0439] 共同组成20S蛋白酶体的所有七个 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的存在和随后在外来体中20S蛋白酶体酶活性的验证显示,MSC外来体的治疗活性可以部分归因于20S蛋白酶体的存在。20S蛋白酶体负责大约90%的所有细胞内氧化损伤蛋白<sup>40</sup>的降解且减弱的蛋白酶体活性已被假定为衰老相关神经退行性疾病的病理发生中的促进因素,所述疾病例如阿尔茨海默氏病和帕金森



森氏病<sup>41,42</sup>或心血管疾病<sup>43-45</sup>。

[0440] MSC外来体通过CD73水解AMP为腺苷和随后通过腺苷受体诱导AKT和ERK1/2的磷酸化的生化潜力显示, MSC外来体具有水解由不良细胞释放的AMP和刺激存活信号转导通路的能力。来自欧洲心脏病学会的最近的立场文件(position paper)突出显示, 腺苷受体的激活和例如PI3激酶-AKT和ERK1/2促存活激酶的磷酸化可能在限制性再灌注损伤中具有作用<sup>46</sup>。因此, 已经显示具有心肌保护作用<sup>46,47</sup>的腺苷受体的活化也可以是介导外来体改良再灌注损伤的分子机制。

[0441] 外来体上CD59抑制补体介导的红细胞裂解代表另外一个外来体的心肌保护作用的候选机制。补体激活是例如肠、心脏和肾脏组织中缺血/再灌注损伤的已知媒介, 并且它的减弱或抑制已经显示改良组织损伤<sup>48-50</sup>。

[0442] 总之, 本发明人的外来体蛋白质组研究和生化验证已经揭示了各种各样的生化和细胞活性, 并且鉴定了外来体的心肌保护作用的几个候选通路。进一步在合适的动物模型中的验证研究将需要确定一个或多个这些候选通路是否促成MSC外来体在急性心肌损伤治疗中减少再灌注损伤的有效性<sup>51</sup>。MSC外来体中生化潜力的多数提供同时靶向多于一种组织损伤的媒介并潜在地诱导与在组合药物治疗中观察到的相似的治疗的协同作用的可能性。能够靶向损伤的多个媒介的可能性进一步由使用酶驱动这些靶向活性增强。由于酶活性取决于它们的微环境, 例如底物浓度或pH, 基于酶的外来体的治疗活性可以与疾病沉淀的微环境的严重程度成比例地被激活或被减弱。于是, 基于外来体治疗的有效性会对疾病沉淀的微环境呈高度反应性并被其所限制。总之, 这些特点可能使得基于外来体的治疗本质上更安全并更有效。

[0443] 实施例19. 结果-MSC外来体激活TLR

[0444] 使用两种衍生自THP-1(已知表达大部分人类TLR的急性单核白血病细胞系)的细胞系来首次评估MSC外来体激活TLR的潜力。第一细胞系是在NF- $\kappa$ B启动子的转录控制下稳定转染分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因的THP1-XBlue。第二细胞系是MyD88活性缺陷的THP1-XBlue-defMYD, 这样, THP1-XBlue而不是THP1-XBlue-defMYD的激活显示TLR配体的存在。在0.1 $\mu$ g/ml, MSC外来体激活THP1-XBlue至与0.01 $\mu$ g/ml的LPS的激活程度相同的程度, 并且与LPS不同, 这种激活没有被多粘菌素B(polymyxin B)破坏, 这排除在MSC外来体制备物中LPS的污染。MSC外来体和LPS均没有激活THP1-XBlue-defMYD, 这显示THP1XBlue的激活仅由THP-1细胞上存在的一些TLR的激活介导(图6)。

[0445] 由于MSC外来体包含推定的TLR2和TLR4的配体, 它们被使用稳定转染人类TLR2或TLR4和SEAP报告系统的HEK报告细胞系检测了激活这些受体的潜力(图7和图8)。尽管MSC外来体包含TLR2和TLR4二者的内源性配体, 仅TLR4被0.1 $\mu$ g/ml外来体激活。1.0 $\mu$ g/ml外来体对TLR2有一些小但显著的( $p < 0.01$ )激活显示MSC外来体激活TLR2的能力至少低10倍。由于外来体激活TLR4没有被多粘菌素B破坏, 这排除了在MSC外来体制备物中LPS的污染。因此, MSC外来体可以激活TLR4但不激活TLR2。

[0446] 实施例20. MSC外来体具有TLR配体-方法

[0447] MSC外来体上TLR配体的存在使用两种衍生自THP-1(已知表达大部分人类TLR的急性单核白血病细胞系)的细胞系来确定。第一细胞系是在NF- $\kappa$ B启动子的转录控制下稳定转染分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因的THP1-XBlue。第二细胞系是MyD88活性缺陷的

THP1-XBlue-defMYD。10<sup>5</sup>细胞/孔接种于96孔板并与10ng/ml LPS(*E. coli*026:B6, Sigma)或0.1μg/ml MSC衍生的外来体(MSC-Exo)在有或者没有多粘菌素B(一种结合并失活LPS的抗生素)的情况下孵育24小时。SEAP水平用Quanti-Blue(InvivoGen)(一种碱性磷酸酶的荧光底物)进行分析。

[0448] 结果显示于图7中。

[0449] 实施例21. MSC外来体不激活TLR2-方法

[0450] MSC外来体的TLR2激活潜力使用市售的已经稳定共转染在NF-κB启动子转录控制下的人类TLR2、MD2和CD14以及优化的分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因的HEK293细胞系来进行评估。这个细胞系, HEK-Blue-hTLR2(Invitrogen)以10<sup>4</sup>细胞/孔接种于96孔板并与10μg/ml脂磷壁酸(LTA, 金黄色葡萄球菌, Sigma)或0.1、0.5和1.0μg/ml MSC衍生的外来体(MSC-Exo)孵育24小时。SEAP水平用Quanti-Blue(InvivoGen)(一种碱性磷酸酶的荧光底物)进行分析。

[0451] 结果显示于图8中。

[0452] 实施例22. MSC外来体激活TLR4-方法

[0453] MSC外来体的TLR4激活潜力使用市售的已经稳定共转染在NF-κB启动子的转录控制下的人类TLR4、MD2和CD14以及优化的分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因的HEK293细胞系来进行评估。这个细胞系, HEK-Blue-hTLR4(Invitrogen)以10<sup>4</sup>细胞/孔接种于96孔板并与10ng/ml LPS(*E. coli*026:B6, Sigma)或0.1μg/ml MSC衍生的外来体(MSC-Exo)在有或者没有多粘菌素B(一种结合并失活LPS的抗生素)情况下孵育24小时。SEAP水平用Quanti-Blue(InvivoGen)(一种碱性磷酸酶的荧光底物)进行分析。

[0454] 结果显示于图9中。

[0455] 实施例23. MSC外来体诱导由THP-1细胞的促炎和抗炎细胞因子的产生

[0456] 方法

[0457] THP-1细胞以1×10<sup>6</sup>细胞/ml接种到24孔培养板, 用10ng/ml LPS或0.1μg/ml MSC-Exo刺激0.5、1、3、6、12、24、48、72、96和120小时。收集细胞并用实时定量RT-PCR分析细胞因子产量。总RNA使用RNeasy迷你试剂盒(QIAGEN)提取并使用高容量cDNA反转录试剂盒(ABI P/N. 4368813)进行反转录。PCR在StepOnePlus™实时PCR系统(ABI P/N. 4376592)以总体积20μl进行, 该PCR存在10μl 2×Fast SYBR® Green Master Mix(ABI, P/N4385612)、1μl cDNA和1μl寡核苷酸引物, 起始变性步骤为95°C 10min, 随后是40个循环的95°C变性3s、60°C退火和延伸30s。所使用的引物如下: IL-1β(FW: 5′-CCTGTCCTGCGTGTGAAAGA-3′; RV: 5′-GGGAACTGGGCAGACTCAAA-3′), TNF-α(FW: 5′-CCCCAGGGACCTCTCTCTAATC-3′; RV: 5′-GGTTTGCTACAACATGGGCTACA-3′), IL-6(FW: 5′-TCGAGCCCACCGGGAACGAA-3′; RV: 5′-GCAACTGGACCGAAGGCGCT-3′), IL-12p40(FW: 5′-CATGGTGGATGCCGTTCA-3′; RV: 5′-ACCTCCACCTGCCGAGAAT-3′), IL-10(FW: 5′-GTGATGCCCAAGCTGAGA-3′; RV: 5′-CACGGCCTTGCTCTTGT TTT-3′), TGF-β1(FW: 5′-CAGCAACAATTCCTGGCGATA-3′; RV: 5′-AAGGCGAAAGCCCTCAATTT-3′), GAPDH(FW: 5′-GTCTTACCACCATGGAGAAGGCT-3′; RV: 5′-CATGCCAGTGAGCTCCCGTTCA-3′)。对于每个样品, mRNA含量与人类GAPDH mRNA的含量进行归一化并与未处理的对照相比显示n倍表达。每个样品检测三个平行。数据使用比较ΔCT方法和Applied Biosystems StepOne软件版本2.0.1, 根据制造商的说明书, 进行分析。

[0458] 结果

[0459] MSC外来体作用于THP-1细胞的细胞因子产生。

[0460] 由于TLR是调节先天性免疫的激活的一类主要的受体并且MSC外来体可以在人类单核细胞中激活TLR,本发明人测定这种激活是否导致细胞因子的产生(图10)。

[0461] MSC外来体诱导促炎和抗炎细胞因子的双相产生,峰值分别位于3和72-96小时。

[0462] 实施例24.MSC外来体对适应性免疫的调节

[0463] MSC外来体对TLR的激活和对促炎和抗炎细胞因子的诱导显示MSC外来体可以调节适应性免疫。具体地,本发明人检测了MSC外来体是否对Treg或Th17分化具有任何作用。Treg指已知为调节性T细胞或抑制子T细胞的T细胞亚群<sup>12</sup>。它们下调免疫系统并维持对自身抗原的耐受。这些细胞已经被用于免疫疾病的免疫治疗,例如过敏和哮喘、糖尿病、移植排斥反应等<sup>1314</sup>。Th17细胞是CD4+记忆性T细胞并由它们分泌IL-17细胞因子的标志定义。它们被认为在自身免疫疾病的病理发生中位于中心位置<sup>15</sup>。

[0464] 为了检测MSC外来体对CD4+小鼠T细胞分化为Treg或Th17细胞的作用,CD4+小鼠细胞与MSC外来体孵育。作为阳性对照,CD4+小鼠细胞由TGF- $\beta$ 1诱导分化为Treg细胞并且由IL-6&TGF- $\beta$ 1诱导分化为Th17细胞。它们均未对CD4+小鼠T细胞分化为CD4+CD25+Foxp3+Treg或Th17细胞施加任何作用(图11)。

[0465] 实施例25.诱导CD4+小鼠T细胞分化为Treg(a)或Th17细胞(b)

[0466] 如前所述<sup>16</sup>,鼠脾细胞从6至8周龄BALB/C小鼠制备。简要地,去除小鼠脾脏,剁碎并过滤(strained)。然后,裂解红细胞。使用FITC标记的大鼠抗小鼠CD4抗体并用EasySep FITC选择试剂盒(StemCell Technologies)收集CD4+细胞,并且纯度由流式细胞术验证为>95%。纯化的CD4<sup>+</sup>T细胞使用抗CD3mAb和5 $\mu$ g/ml的抗CD28mAb激活。a)对于Treg分化:培养基补充10ng/ml rhTGF- $\beta$ 1或0.1 $\mu$ g/ml MSC-Exo。6天后,由CD4+、CD25+定义的Treg细胞和小鼠Foxp3+细胞的数量由FACS使用标准抗体染色技术来确定。

[0467] b)对Th17分化,培养基补充20ng/ml rIL-6&1ng/ml rhTGF- $\beta$ 1或0.1 $\mu$ g/ml MSC-Exo。6天后,由CD4+、IL17a+细胞定义的Th17细胞的数量由FACS使用标准抗体染色技术来确定。

[0468] a和b中Treg和Th17细胞相对于未处理的细胞进行归一化。

[0469] 实施例26.MSC外来体对适应性免疫的调节

[0470] 由于MSC外来体对THP-1细胞施加了深远的激活作用以及先天性免疫在调节适应性免疫反应中起着核心作用,本发明人假设外来体可以通过其作用于先天性免疫调节适应性免疫。为了检测这个假设,本发明人以一些修饰重复了图11所述的实验。在CD4+细胞分化为Treg或TH17细胞的过程中,T细胞与已经暴露于外来体6天的THP-1细胞孵育(图12)。作为阳性对照,T细胞分别与TGF- $\beta$ 1或rIL-6+TGF- $\beta$ 1孵育。已经暴露于MSC外来体48小时的THP-1细胞诱导T细胞分化为Treg但不分化为TH17细胞,显示MSC外来体能够诱导免疫抑制但不诱导促炎性T细胞反应。

[0471] 实施例27.通过先天性免疫调节适应性免疫

[0472] CD4+小鼠T细胞被纯化并如图11中所述进行激活。

[0473] a)对Treg分化:培养基补充10ng/ml rhTGF- $\beta$ 1,THP-1细胞或THP-1细胞暴露于0.1 $\mu$ g/ml MSC外来体48小时。THP-1细胞所加比例为1THP-1对1000CD4+小鼠T细胞。6天后,由

CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>定义的Treg细胞和小鼠Foxp3<sup>+</sup>细胞的数量由FACS使用标准抗体染色技术来确定。

[0474] b)对Th17分化,培养基补充20ng/ml rIL-6&1ng/ml rhTGF-β1或或THP-1细胞暴露于0.1μg/ml MSC外来体48小时。THP-1细胞所加比例为1THP-1对1000CD4<sup>+</sup>小鼠T细胞。6天后,由CD4<sup>+</sup>、IL17a<sup>+</sup>定义的Th17细胞的数量由FACS使用标准抗体染色技术来确定。

[0475] a和b中Treg和Th17细胞相对于未处理的细胞进行归一化。

[0476] 实施例28.MSC外来体刀豆蛋白A激活淋巴细胞增殖分析

[0477] MSC外来体可以通过它们抑制刀豆蛋白A激活的淋巴细胞的增殖的能力来分析。参见图13。

[0478] 分离小鼠脾细胞并用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记。CFSE标记的脾细胞与不同浓度的MSC外来体(0.1、0.5、1和4μg/ml)在存在或不在5μg/ml刀豆蛋白A(ConA)下孵育3天。

[0479] MSC外来体按照先前描述(Lai等人,见下文)进行准备。每个处理组的荧光细胞的数量由FACS定量。数据相对于未处理的对照进行归一化并以三个重复样品的平均数(±SD)呈现。

[0480] MSC-Exo并没有影响脾细胞的增殖(p>0.05)并且4.0μg/ml MSC-Exo显著抑制ConA刺激的脾细胞的增殖(\*p<0.01)。

[0481] 文献参考R.C.Lai,F.Arslan,M.M.Lee,N.S.Sze,A.Choo,T.S.Chen,M.Salto-Tellez,L.Timmers,C.N.Lee,R.M.El Oakley,G.Pasterkamp,D.P.de Kleijn,S.K.Lim, Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury, Stem Cell Res,4(2010)214-222。

[0482] 实施例29.结论(对实施例19-28)

[0483] MSC外来体能够激活促炎和抗炎先天性免疫反应但仅能够间接通过先天性免疫系统诱导抑制的适应性免疫反应。它们不直接或间接激活炎症适应性免疫反应。

[0484] 因此,MSC外来体可以被用于增强组织修复和抑制自身免疫疾病的疾病进展,例如GVHD、克罗恩病、SLE、1型糖尿病、多发性硬化、ALS。

[0485] 实施例30.参考文献(对实施例19-29)

[0486] 1Kawai,T.&Akira,S.The roles of TLRs,RLRs and NLRs in pathogen recognition ARTICLE.International Immunology21,317-337,doi:10.1093/intimm/dxp017(2009).

[0487] 2Devitt,A.&Marshall,L.J.The innate immune system and the clearance of apoptotic cells.Journal of Leukocyte Biology90,447-457,doi:10.1189/jlb.0211095(2011).

[0488] 3Iwasaki,A.&Medzhitov,R.Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System.Science327,291-295,doi:10.1126/science.1183021(2010).

[0489] 4Yu,L.,Wang,L.&Chen,S.Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance.Journal of Cellular and Molecular Medicine14,2592-2603,doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x(2010).

[0490] 5Nauta,A.J.&Fibbe,W.E.Immunomodulatory properties of mesenchymal

stromal cells. *Blood* 110, 3499–3506, doi:10.1182/blood-2007-02-069716 (2007).

[0491] 6 Le Blanc, K. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet* 371, 1579–1586 (2008).

[0492] 7 Garcia-Olmo, D. et al. A Phase I Clinical Trial of the Treatment of Crohn's Fistula by Adipose Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Diseases of the Colon & Rectum* 48, 1416–1423. doi:10.1007/s10350-10005-10052-10356 (2005).

[0493] 8 Singer, N. G. & Caplan, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6, 457–478, doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130230 (2011).

[0494] 9 Timmers, L. et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research* 1, 129–137 (2008).

[0495] 10 Timmers, L. et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Research* 6, 206–214, doi:10.1016/j.scr.2011.01.001 (2011).

[0496] 11 Lai, R. C. et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 4, 214–222, doi:10.1016/j.scr.2009.12.003 (2010).

[0497] 12 Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523–532 (2008).

[0498] 13 Riley, J. L., June, C. H. & Blazar, B. R. Human T Regulatory Cell Therapy: Take a Billion or So and Call Me in the Morning. *Immunity* 30, 656–665 (2009).

[0499] 14 Nandakumar, S., Miller, C. & Kumaraguru, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clinical and Molecular Allergy* 7, 5 (2009).

[0500] 15 Perry, D., Peck, A. B., Carcamo, W. C., Morel, L. & Nguyen, C. Q. The Current Concept of T H17 Cells and Their Expanding Role in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis* 2011, doi:10.1155/2011/810649 (2011).

[0501] 16 Su, P. F. et al. Dioscorea phytochemicals enhance murine splenocyte proliferation ex vivo and improve regeneration of bone marrow cells in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, 731308, doi:10.1093/ecam/neq032 (2011).

[0502] 参考文献

[0503] 1. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967–978 (1983).

[0504] 2. Thery, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 581–593 (2009).

[0505] 3. Fevrier, B. & Raposo, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping

extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol*16,415-421(2004).

[0506] 4. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*107,102-108 (2006).

[0507] 5. Zitvogel, L., et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*4,594-600(1998).

[0508] 6. Wolfers, J., et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*7,297-303 (2001).

[0509] 7. Skokos, D., et al. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *Journal of Immunology*170,3037-3045(2003).

[0510] 8. Taylor, D. D. & Gercek-Taylor, C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *British Journal of Cancer*92, 305-311(2005).

[0511] 9. Lai, R. C., et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*4,214-222(2010).

[0512] 10. Lai, R. C., et al. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. *J Mol Cell Cardiol*48,1215-1224(2010).

[0513] 11. Sze, S. K., et al. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics*6,1680-1689(2007).

[0514] 12. Chen, T. S., et al. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res*38,215-224(2010).

[0515] 13. Lian, Q., et al. Derivation of Clinically Compliant MSCs from CD105+, CD24-Differentiated Human ESCs. *Stem Cells*25,425-436(2007).

[0516] 14. Thomas, P. D., et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*13,2129-2141(2003).

[0517] 15. Thomas, P. D., et al. Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucleic Acids Res*34,W645-650(2006).

[0518] 16. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*21,575-581(2009).

[0519] 17. Barry, F. P. & Murphy, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*36,568-584(2004).

[0520] 18. Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R., Pilkis, J. & Claus, T. Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem*256,3619-

3622(1981).

[0521] 19. Bando, H., et al. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11, 5784–5792 (2005).

[0522] 20. Penefsky, H. S. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1589–1593 (1985).

[0523] 21. Tanaka, K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 12–36 (2009).

[0524] 22. Newman, R. H., Whitehead, P., Lally, J., Coffey, A. & Freemont, P. 20S human proteasomes bind with a specific orientation to lipid monolayers in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1281, 111–116 (1996).

[0525] 23. Evgenia Gerasimovskaya, E. K. Extracellular ATP and adenosine as regulators of endothelial cell function. Implications for health and disease (2010).

[0526] 24. Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B. & Pacher, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7, 759–770 (2008).

[0527] 25. Jacobson, K. A. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handbook of experimental pharmacology*, 1–24 (2009).

[0528] 26. Frangogiannis, N. G., Smith, C. W. & Entman, M. L. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53, 31–47 (2002).

[0529] 27. Davies, A. & Lachmann, P. J. Membrane defence against complement lysis: the structure and biological properties of CD59. *Immunol Res* 12, 258–275 (1993).

[0530] 28. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 575–581 (2009).

[0531] 29. Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L. & Mathivanan, S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 6, 267–283 (2009).

[0532] 30. Raposo, G., et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine* 183, 1161–1172 (1996).

[0533] 31. Valadi, H., et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654–659 (2007).

[0534] 32. Schorey, J. S. & Bhatnagar, S. Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 9, 871–881 (2008).

[0535] 33. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 9, 581–593 (2009).

[0536] 34. Huber, V., Filipazzi, P., Iero, M., Fais, S. & Rivoltini, L. More insights into the immunosuppressive potential of tumor exosomes. *Journal of*

Translational Medicine6(2008).

[0537] 35.Muntasell,A.,Berger,A.C.&Roche,P.A.T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes.EMBO Journal26,4263-4272(2007).

[0538] 36.Zeelenberg,I.S.,et al.Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses.Cancer Research68,1228-1235(2008).

[0539] 37.Zöller, M.Tetraspanins:Push and pull in suppressing and promoting metastasis.Nature Reviews Cancer9,40-55(2009).

[0540] 38.Simpson,R.J.,Jensen,S.S.&Lim,J.W.E.Proteomic profiling of exosomes:Current perspectives.Proteomics8,4083-4099(2008).

[0541] 39.Orrenius,S.,Gogvadze,V.&Zhivotovsky,B.Mitochondrial Oxidative Stress:Implications for Cell Death.Annual Review of Pharmacology and Toxicology47,143-183(2007).

[0542] 40.Jung,T.&Grune,T.The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins.IUBMB Life60,743-752(2008).

[0543] 41.Stadtman,E.R.&Levine,R.L.Protein oxidation.Ann N Y Acad Sci899, 191-208(2000).

[0544] 42.Dunlop,R.A.,Brunk,U.T.&Rodgers,K.J.Oxidized proteins:mechanisms of removal and consequences of accumulation.IUBMB Life61,522-527(2009).

[0545] 43.Sohns,W.,van Veen,T.A.&van der Heyden,M.A.Regulatory roles of the ubiquitin-proteasome system in cardiomyocyte apoptosis.Curr Mol Med10,1-13.

[0546] 44.Willis,M.S.,Townley-Tilson,W.H.,Kang,E.Y.,Homeister,J.W.& Patterson,C.Sent to destroy:the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease.Circ Res106,463-478.

[0547] 45.Tsukamoto,O.,Minamino,T.&Kitakaze,M.Functional alterations of cardiac proteasomes under physiological and pathological conditions.Cardiovasc Res85,339-346(2010).

[0548] 46.Ovize,M.,et al.Postconditioning and protection from reperfusion injury:where do we stand?Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology.Cardiovasc Res87, 406-423(2010).

[0549] 47.Hausenloy,D.J.&Yellon,D.M.New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury:targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase(RISK)-pathway.Cardiovasc Res61,448-460(2004).

[0550] 48.Pamuk,O.N.,et al.Spleen tyrosine kinase inhibition prevents tissue damage after ischemia-reperfusion.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol299, G391-399(2010).

[0551] 49.Castellano,G.,et al.Therapeutic targeting of classical and lectin



pathways of complement protects from ischemia-reperfusion-induced renal damage. *Am J Pathol* 176,1648-1659(2010).

[0552] 50. Busche, M.N., Pavlov, V., Takahashi, K. & Stahl, G.L. Myocardial ischemia and reperfusion injury is dependent on both IgM and mannose-binding lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1853-1859(2009).

[0553] 51. Lai, R.C., et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 4, 214-222(2010).

[0554] 在本文件中提到的每个应用和专利,以及每个上述应用和专利中所引用的或参考的每个文献,包括在审理(prosecution)每个应用和专利(“应用所引用的文件”)的过程中以及每个应用和专利中和应用所引用的文件中引用的或提到的任何产品的任何制造商的说明书或目录,都在此并入本文作为参考。此外,在该文本中引用的所有文件,和在该文本中引用的文件中引用或参考的所有文件,和在该文本中引用或提到的任何产品的任何制造商的说明书或目录,都在此并入本文作为参考。

[0555] 在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员来说是显而易见的。虽然本发明已经结合具体的优选实施方式进行了描述,但是应当理解,要求保护的本发明不应当被不适当地限制于这些具体的实施方式。事实上,用于实施本发明的所描述的模式的各种修改对于分子生物学或相关领域的本领域技术人员来说是显而易见,它们也均落入权利要求保护的范围内。

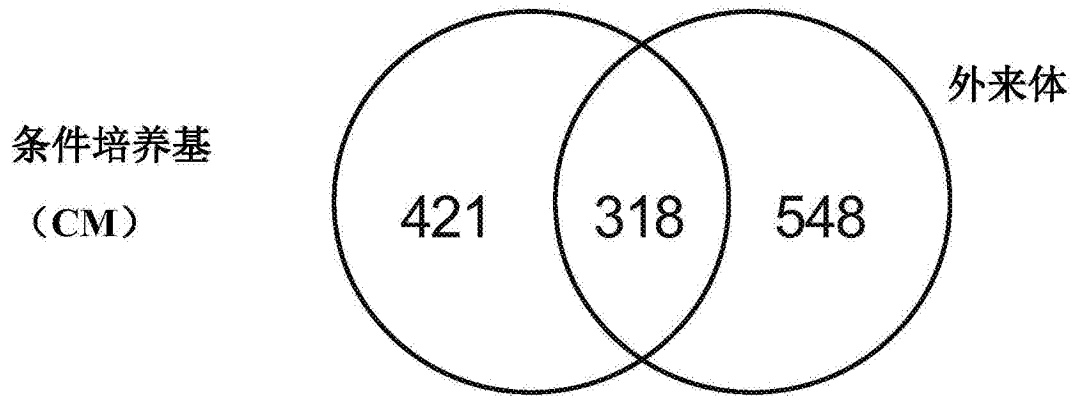


图1

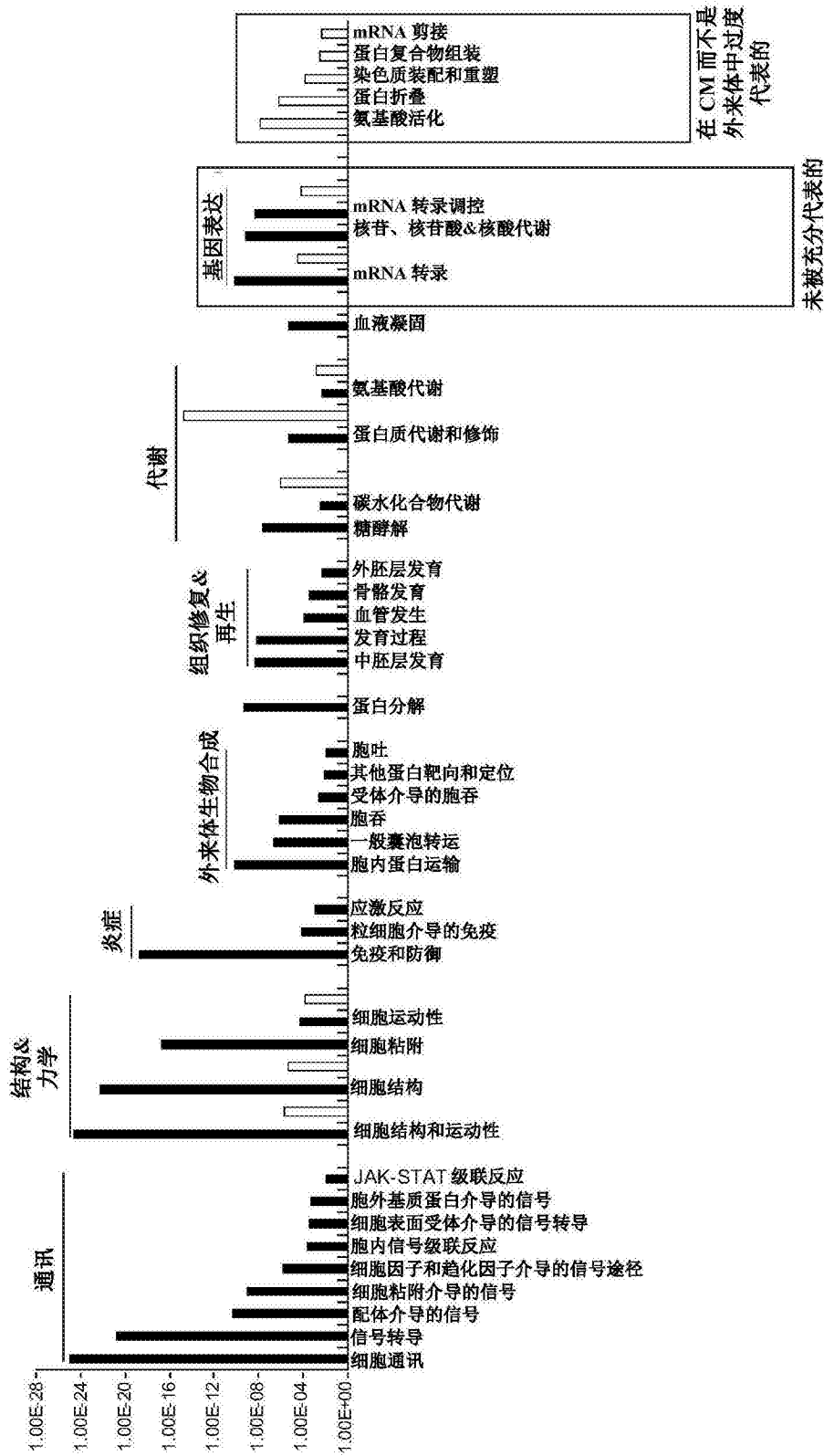


图2

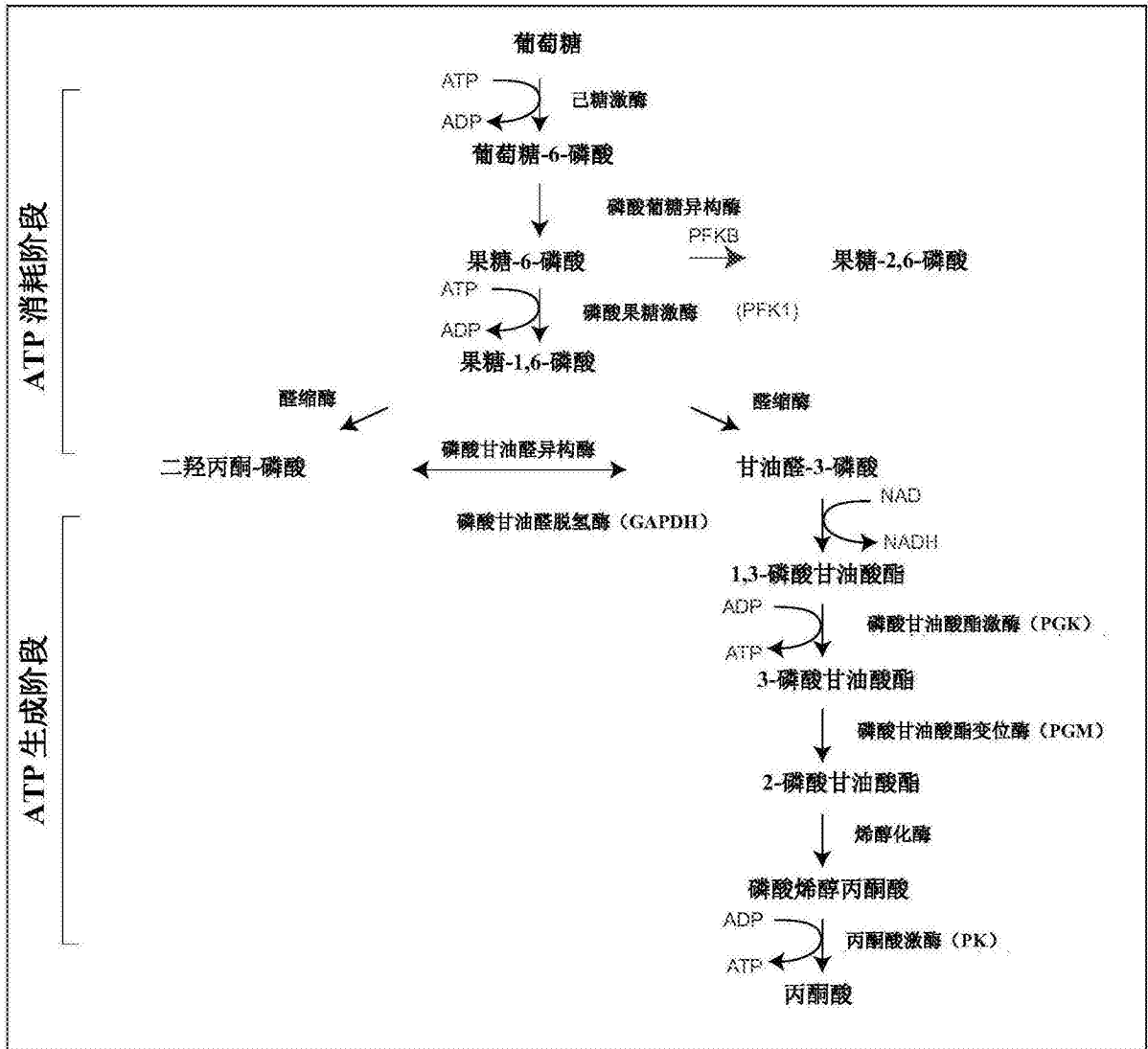


图3A

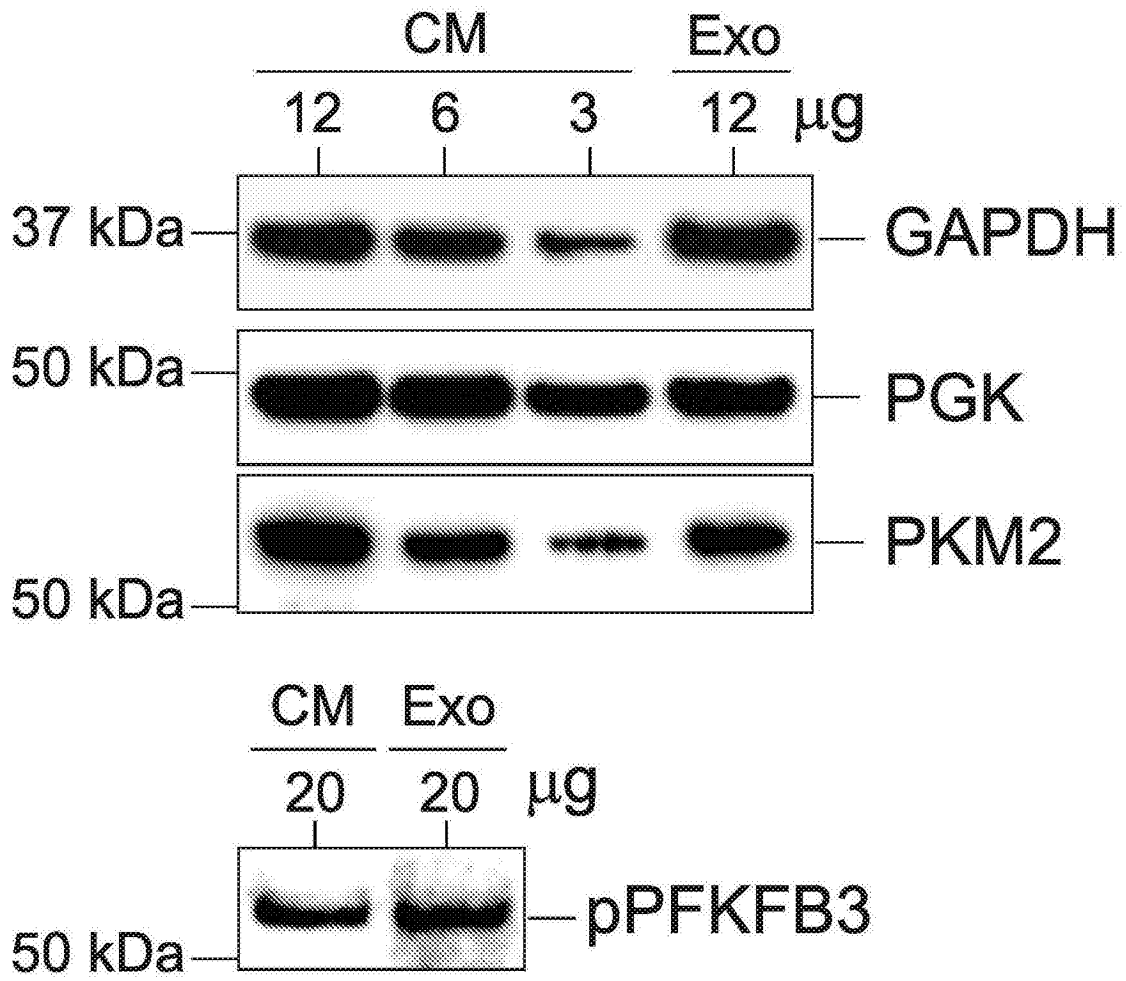


图3B

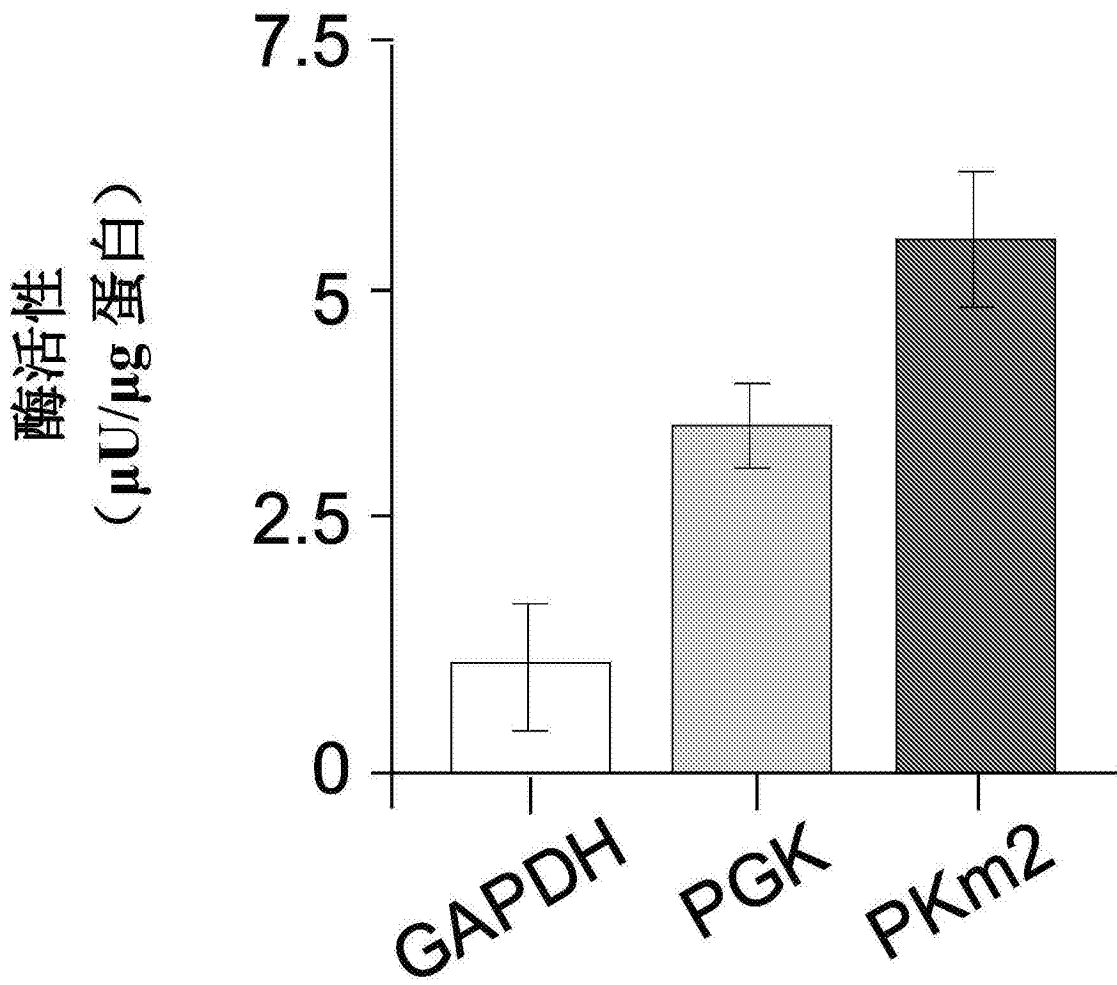


图3C

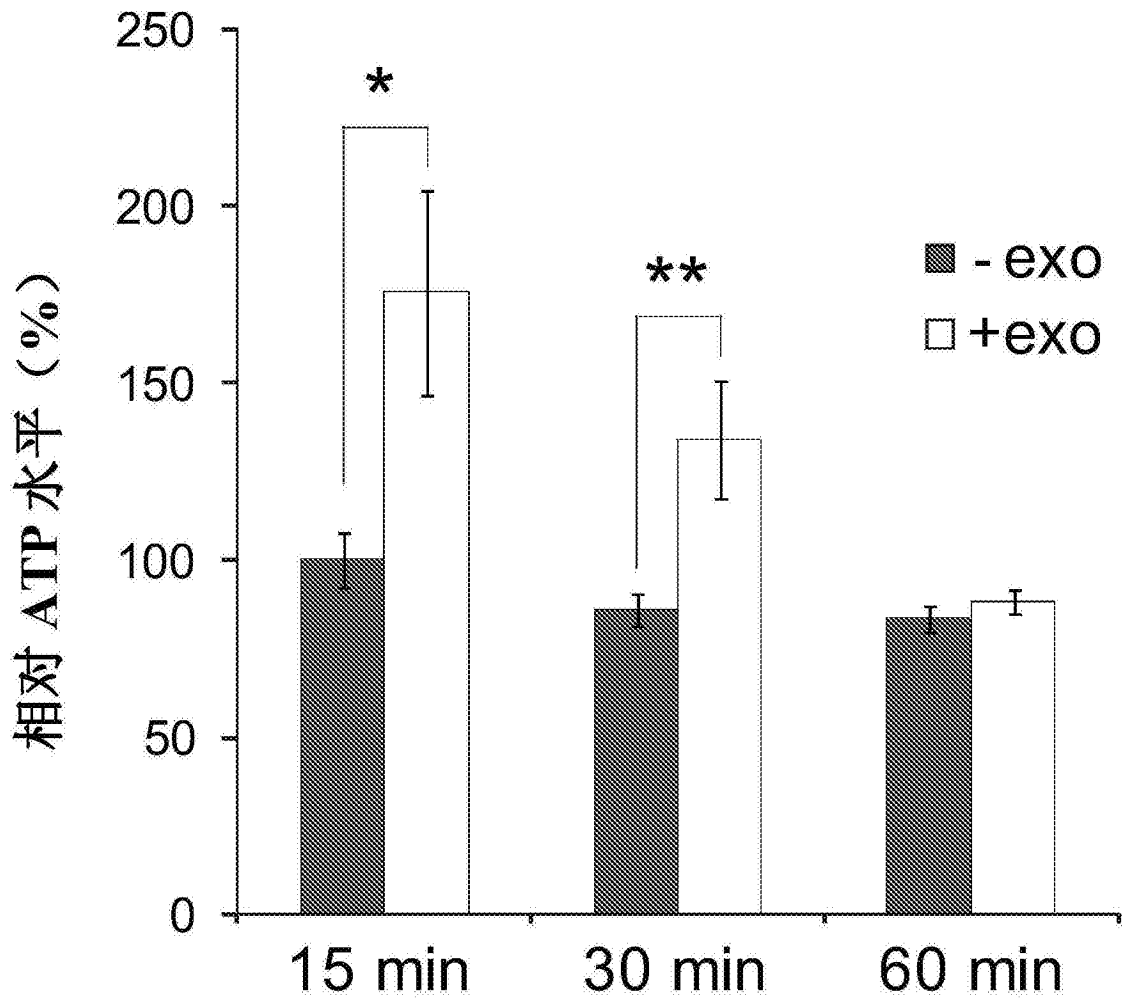


图3D

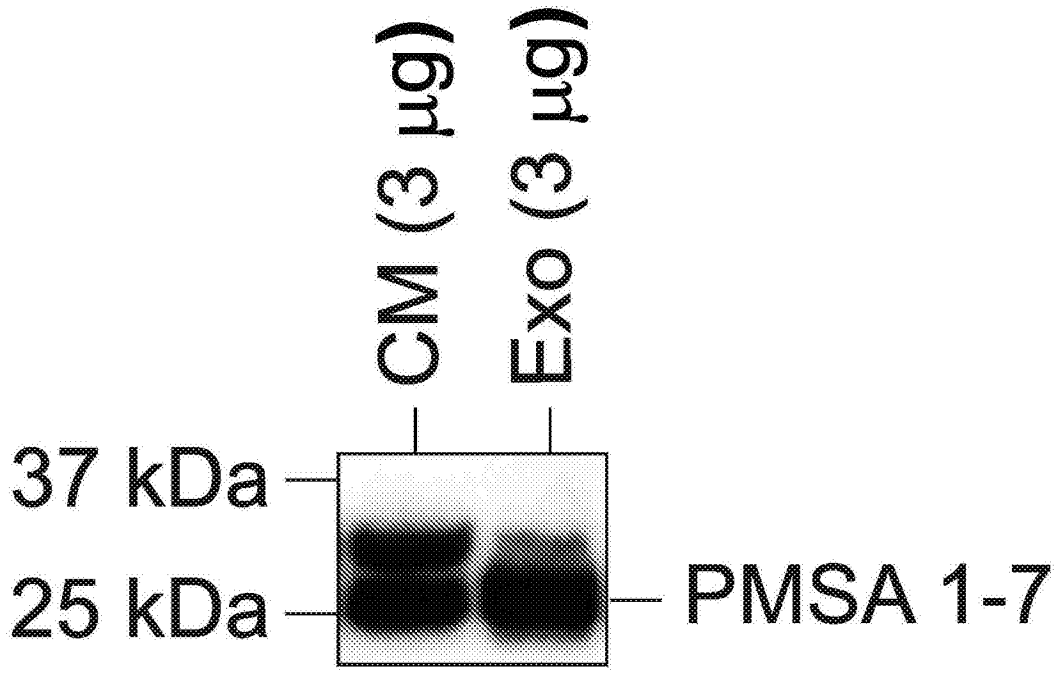


图4A



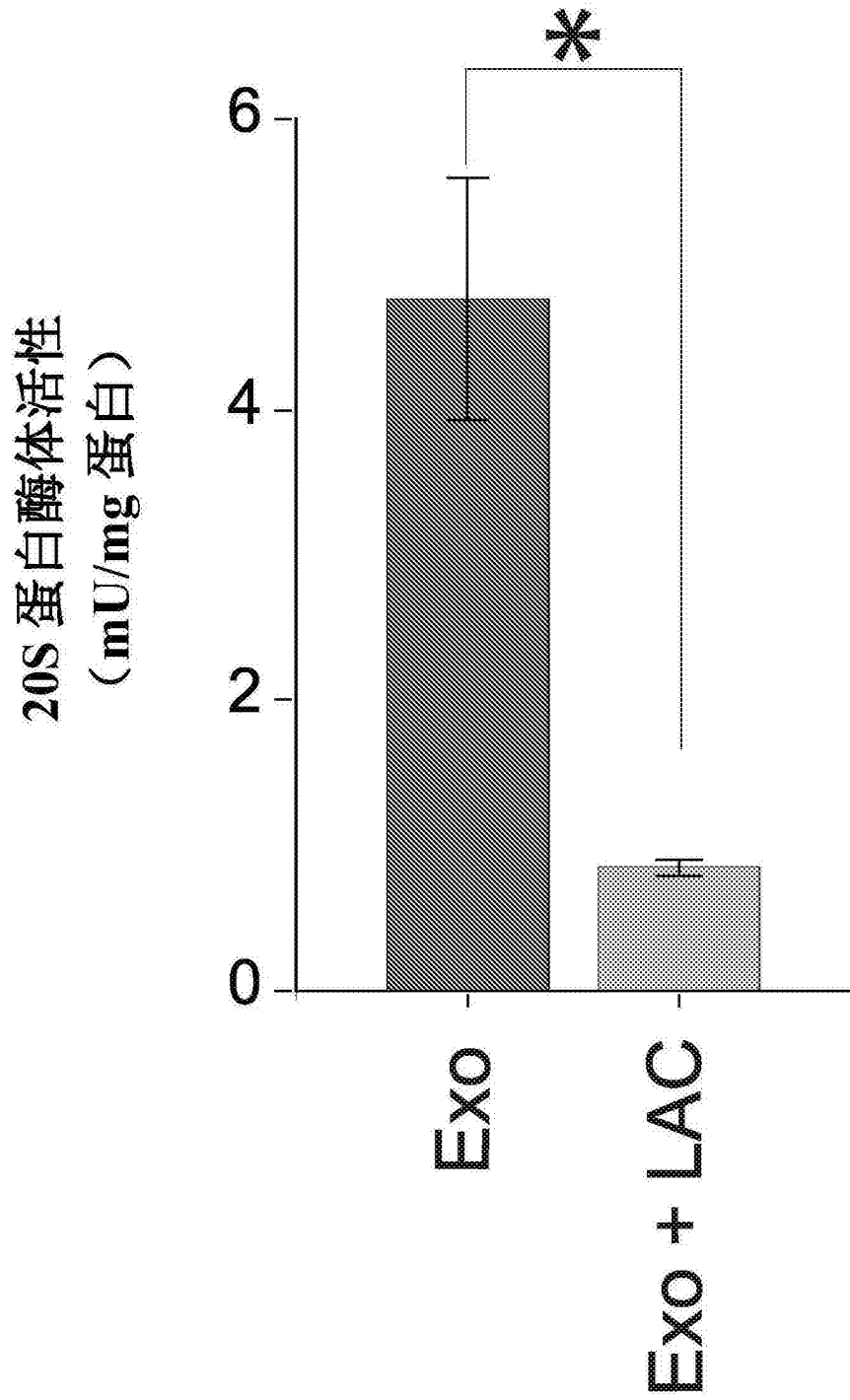


图4B

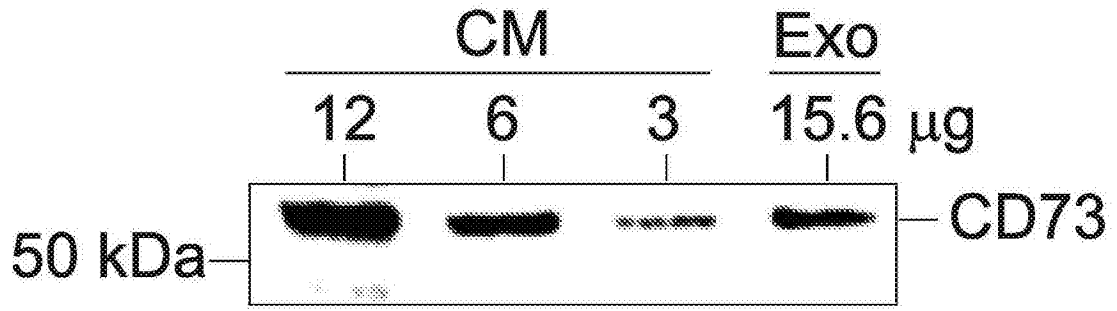


图5A

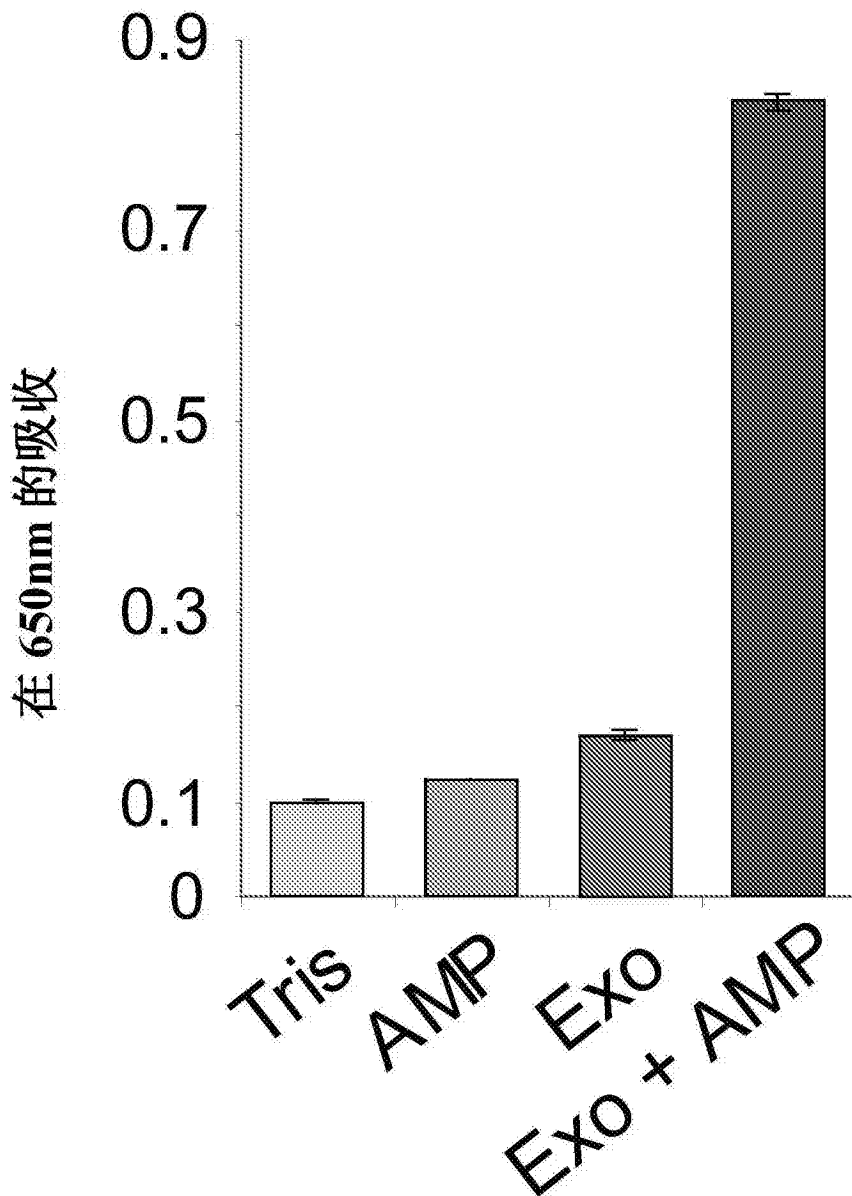


图5B

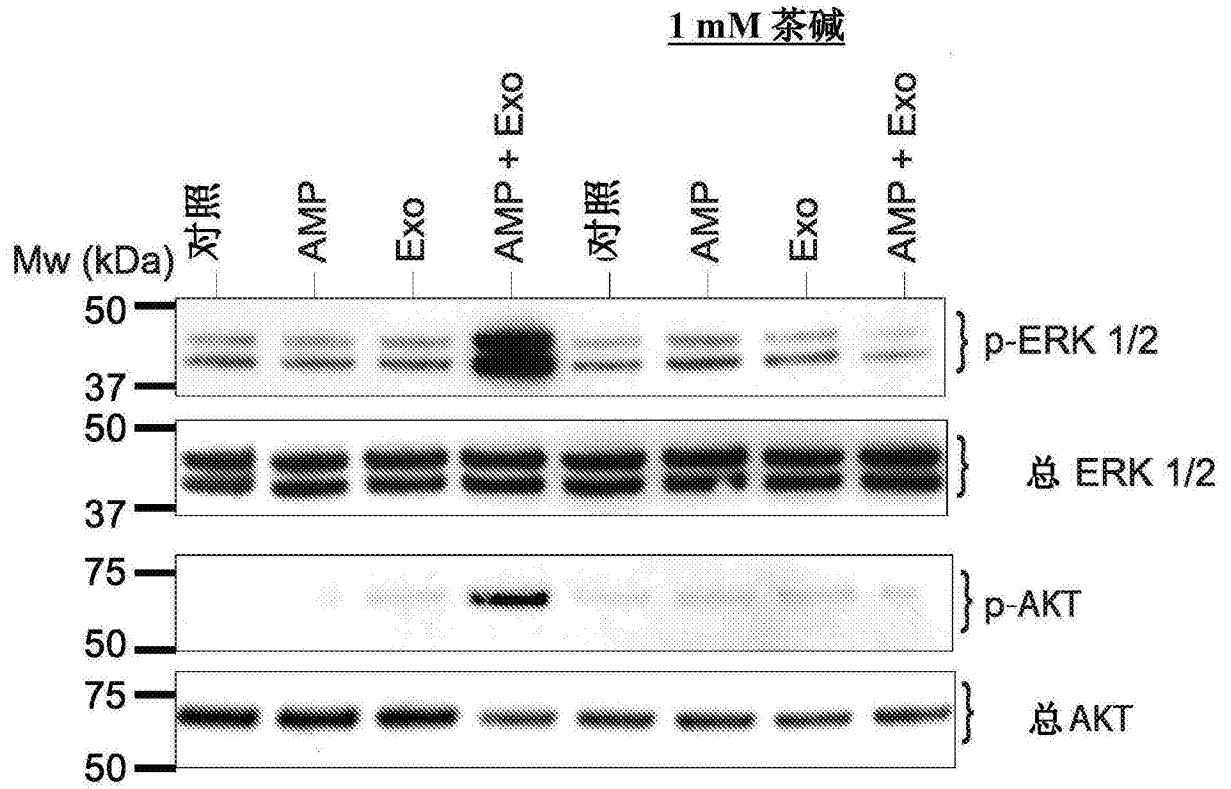


图5C

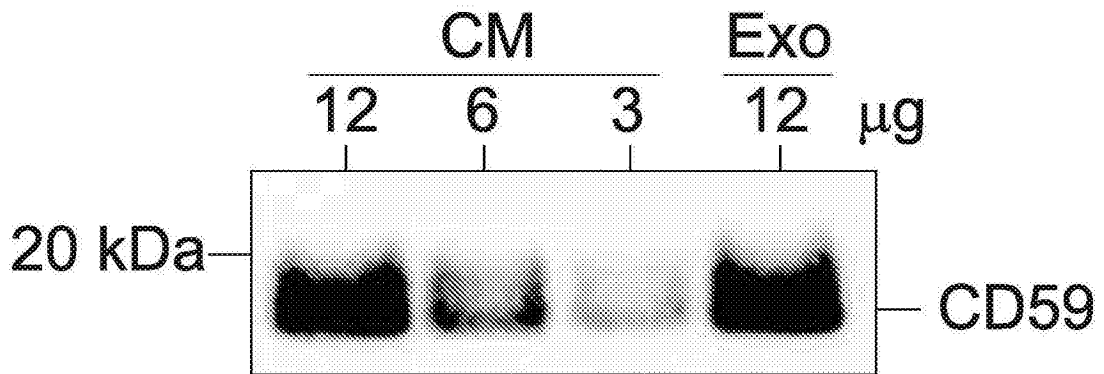


图6A

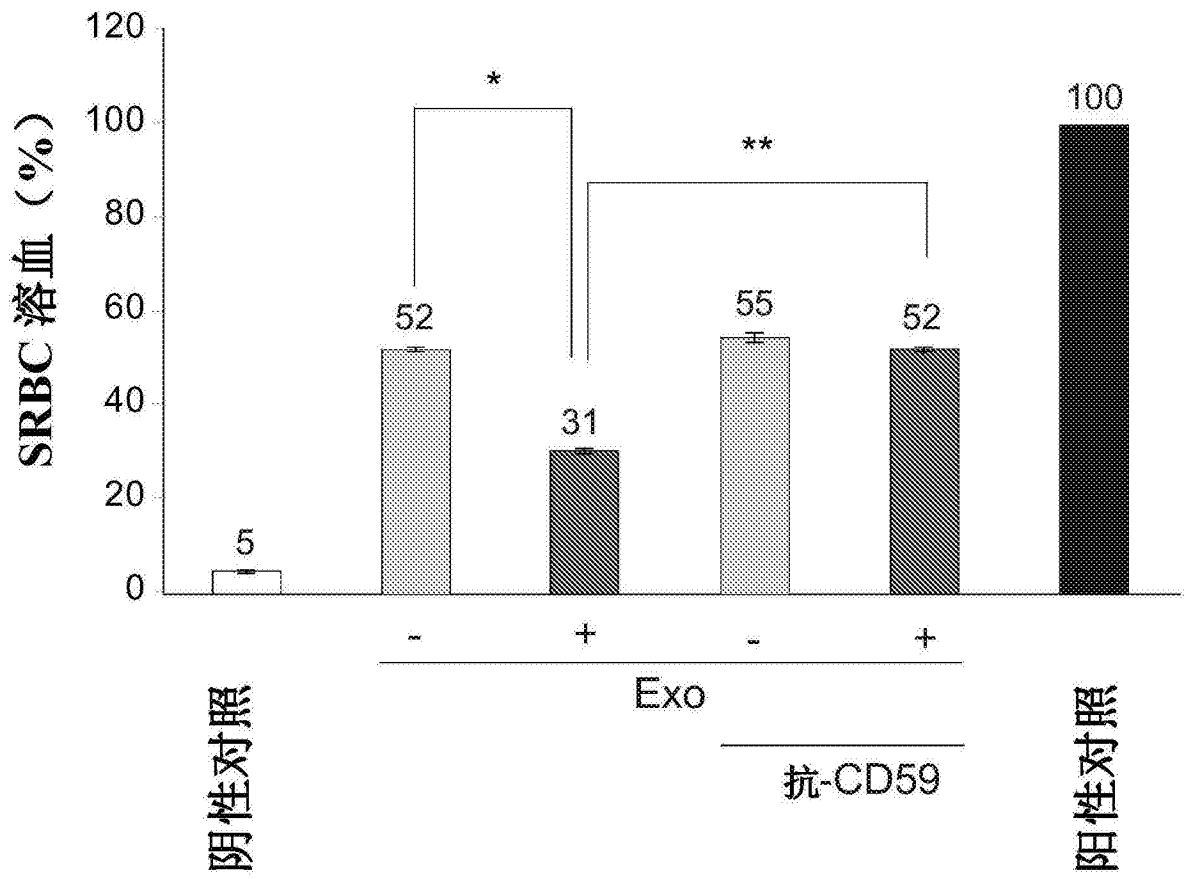


图6B

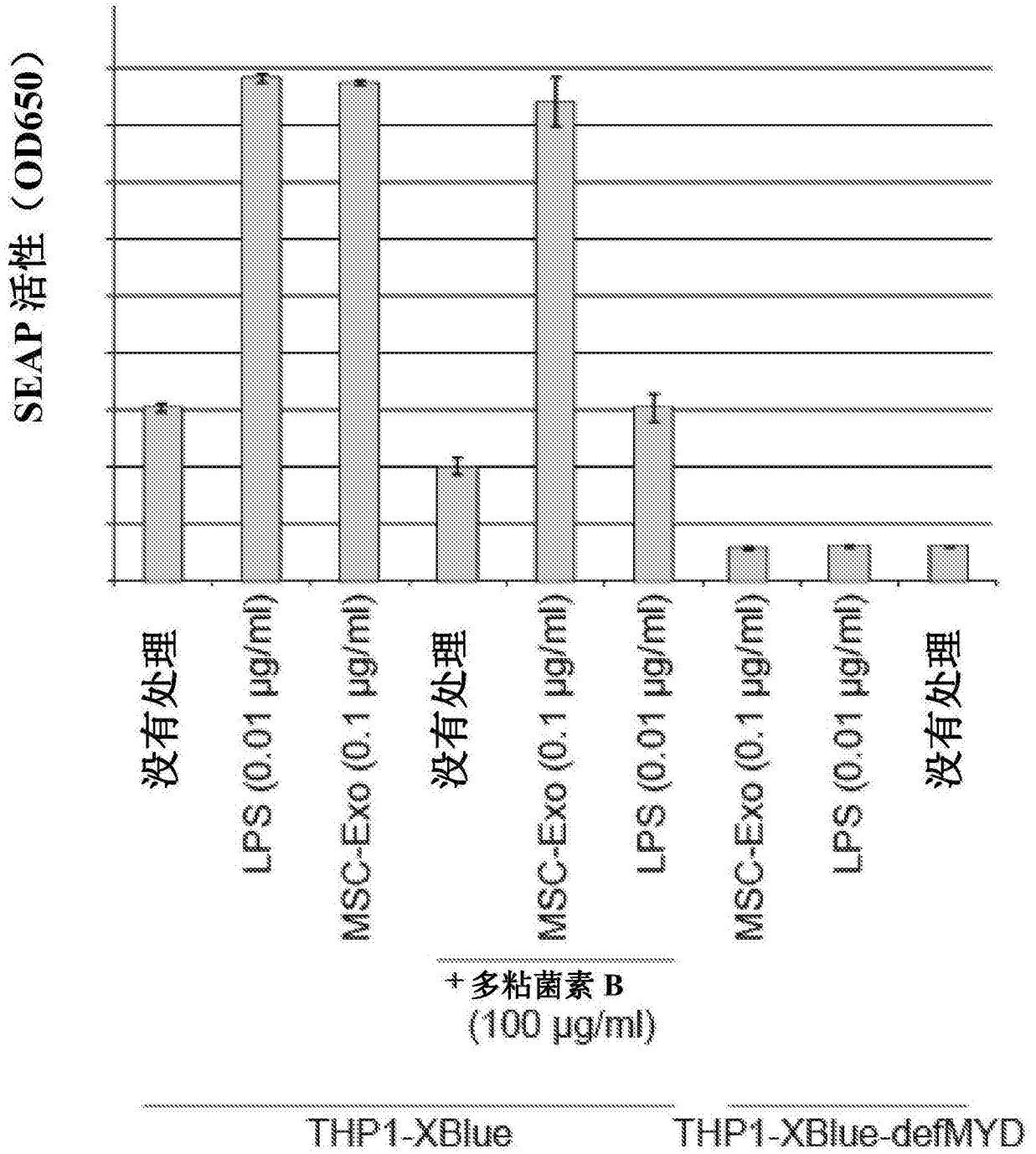


图7

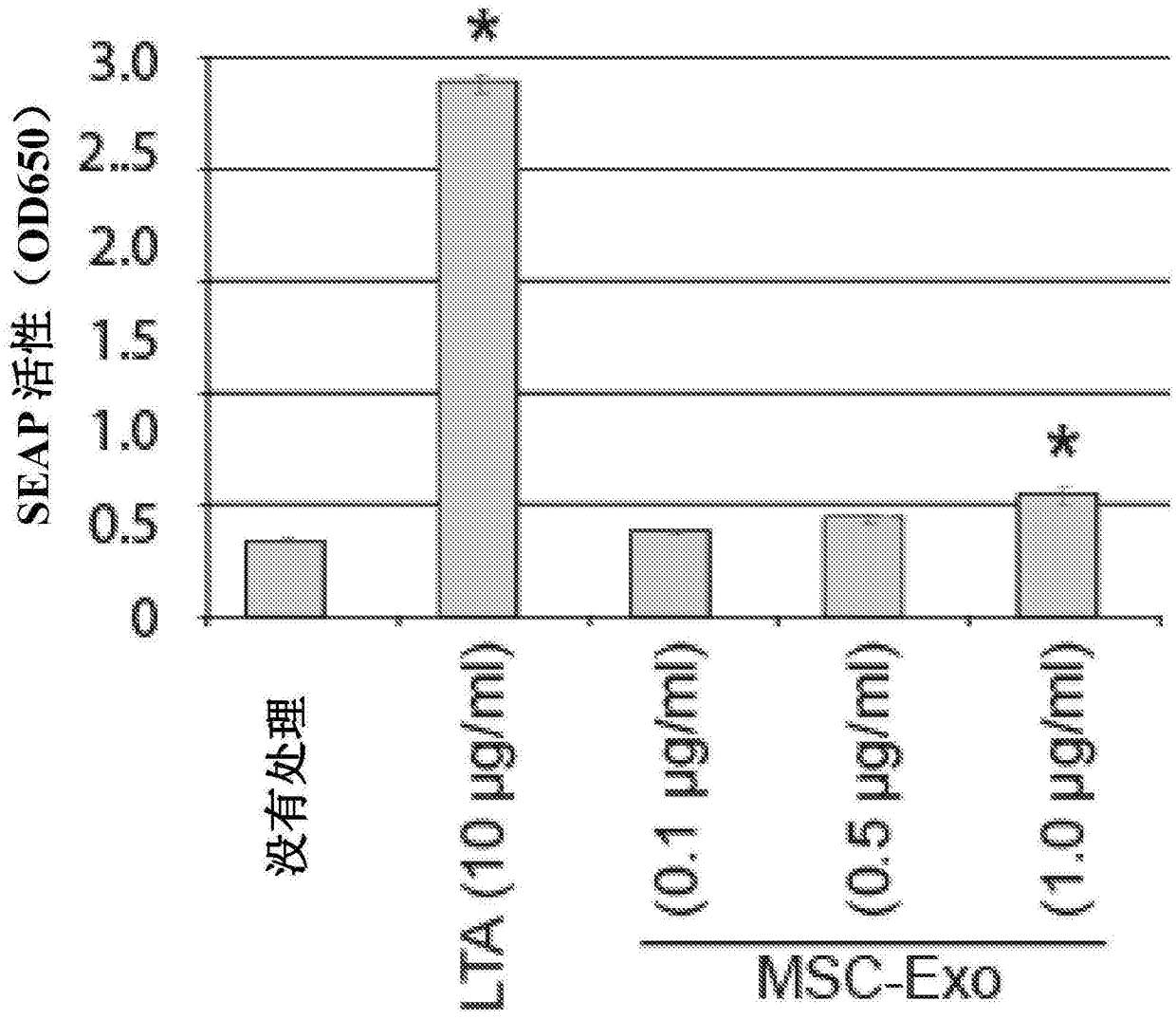


图8

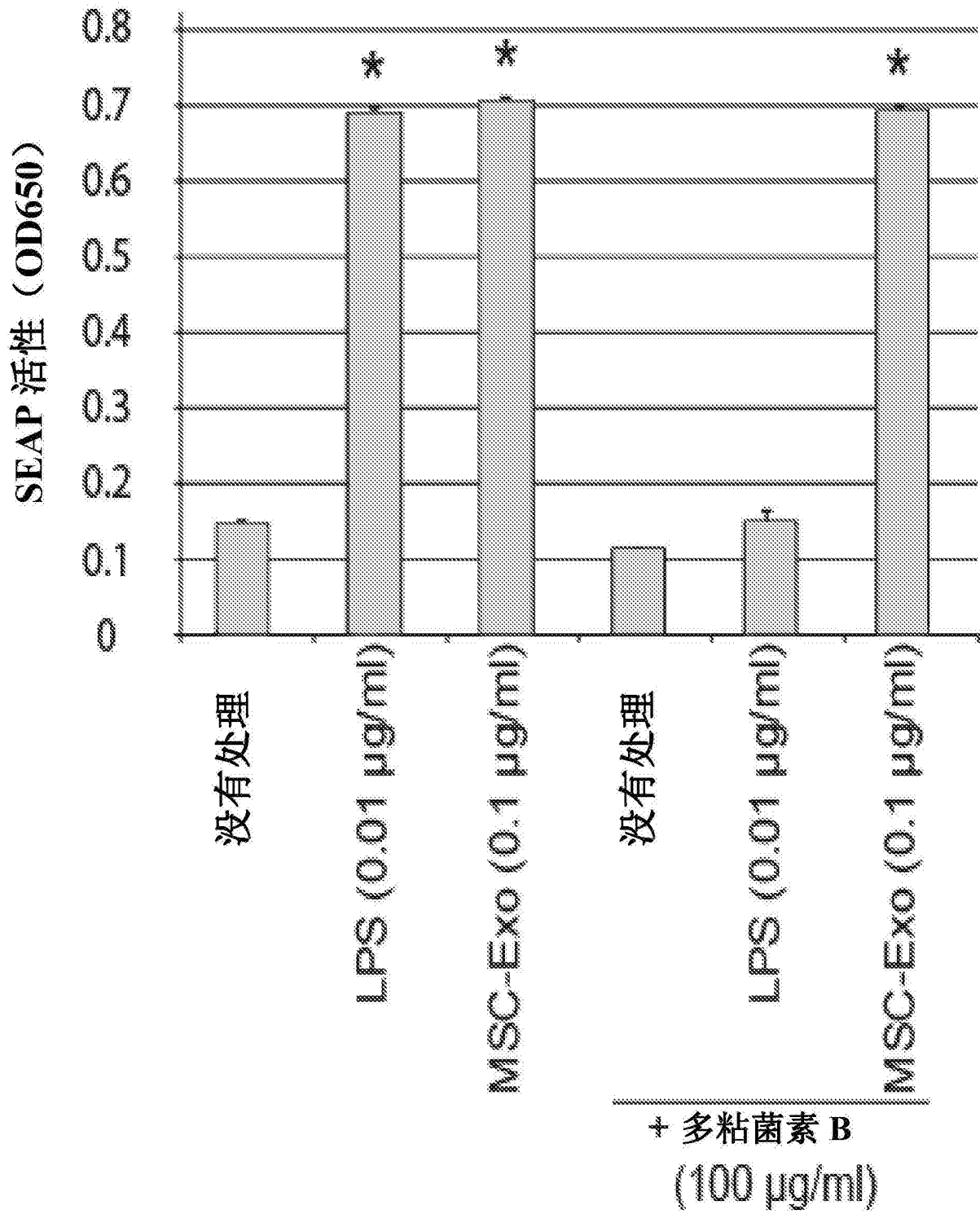


图9

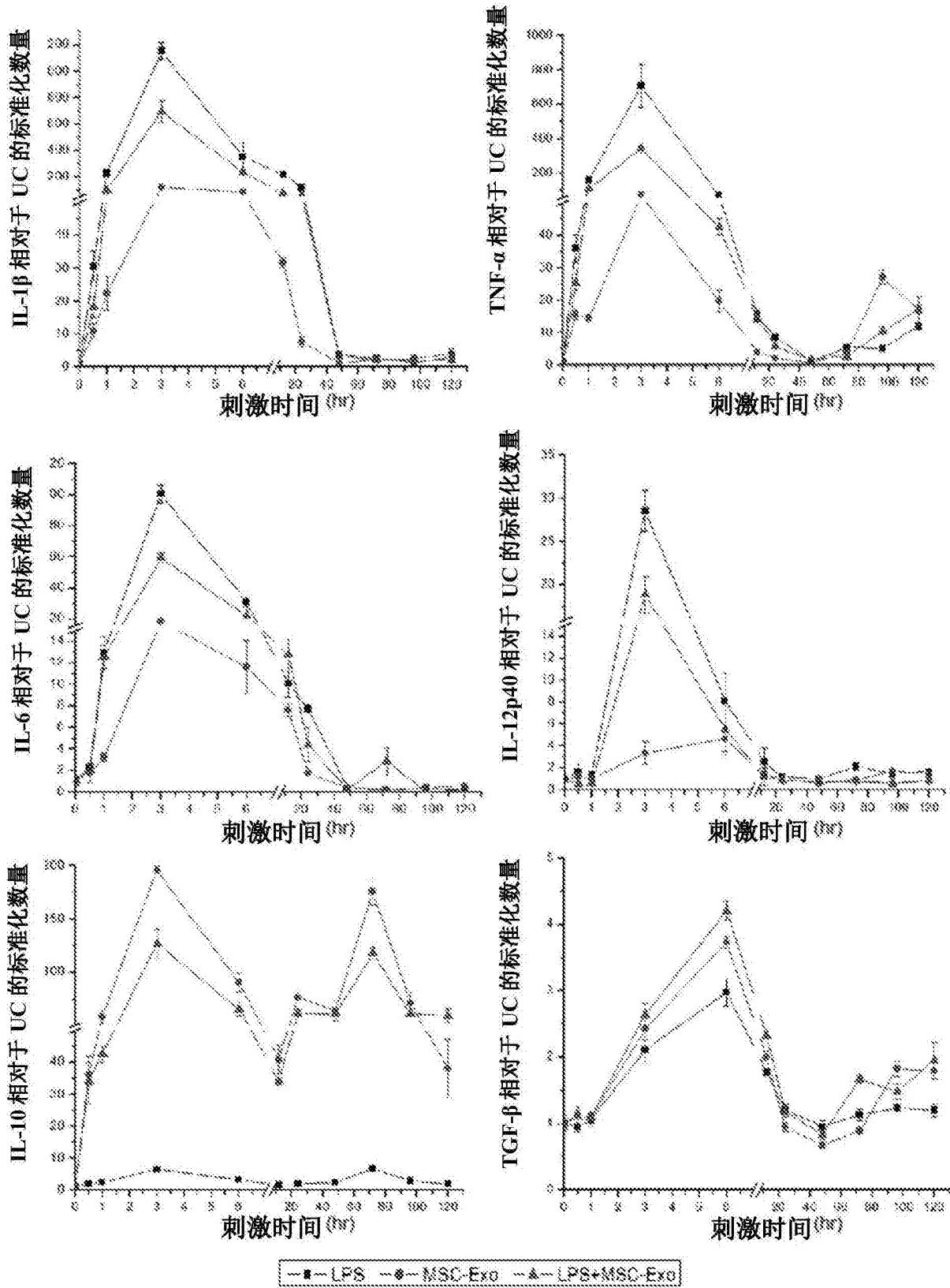


图10



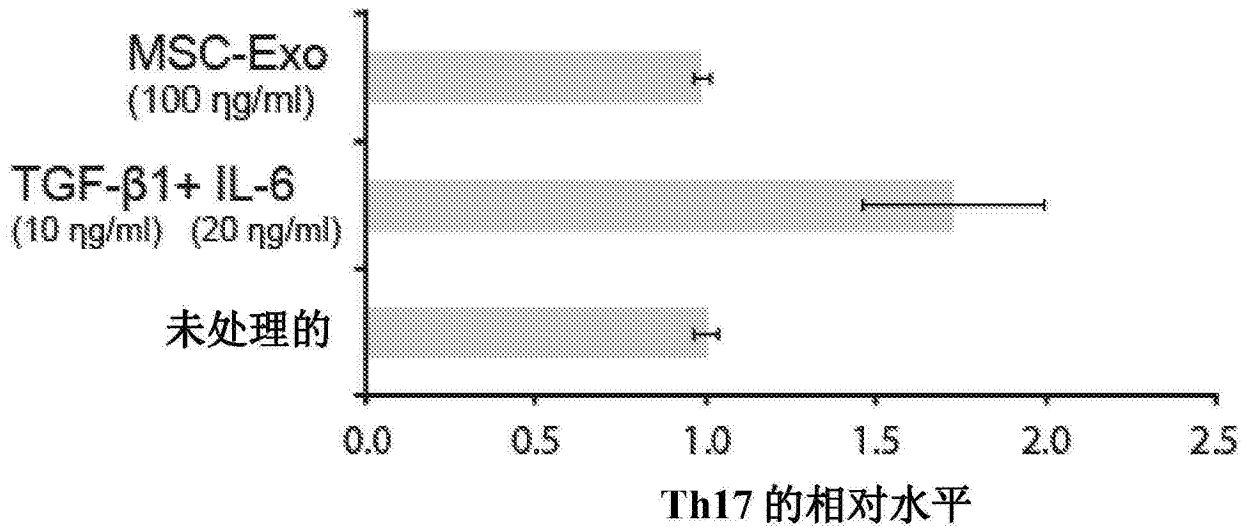


图11A

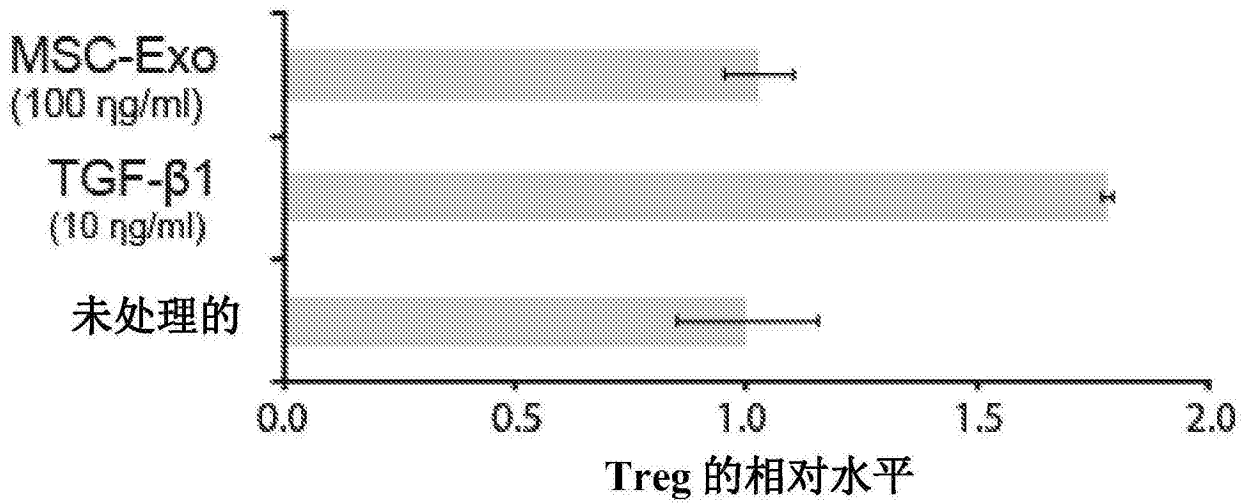


图11B

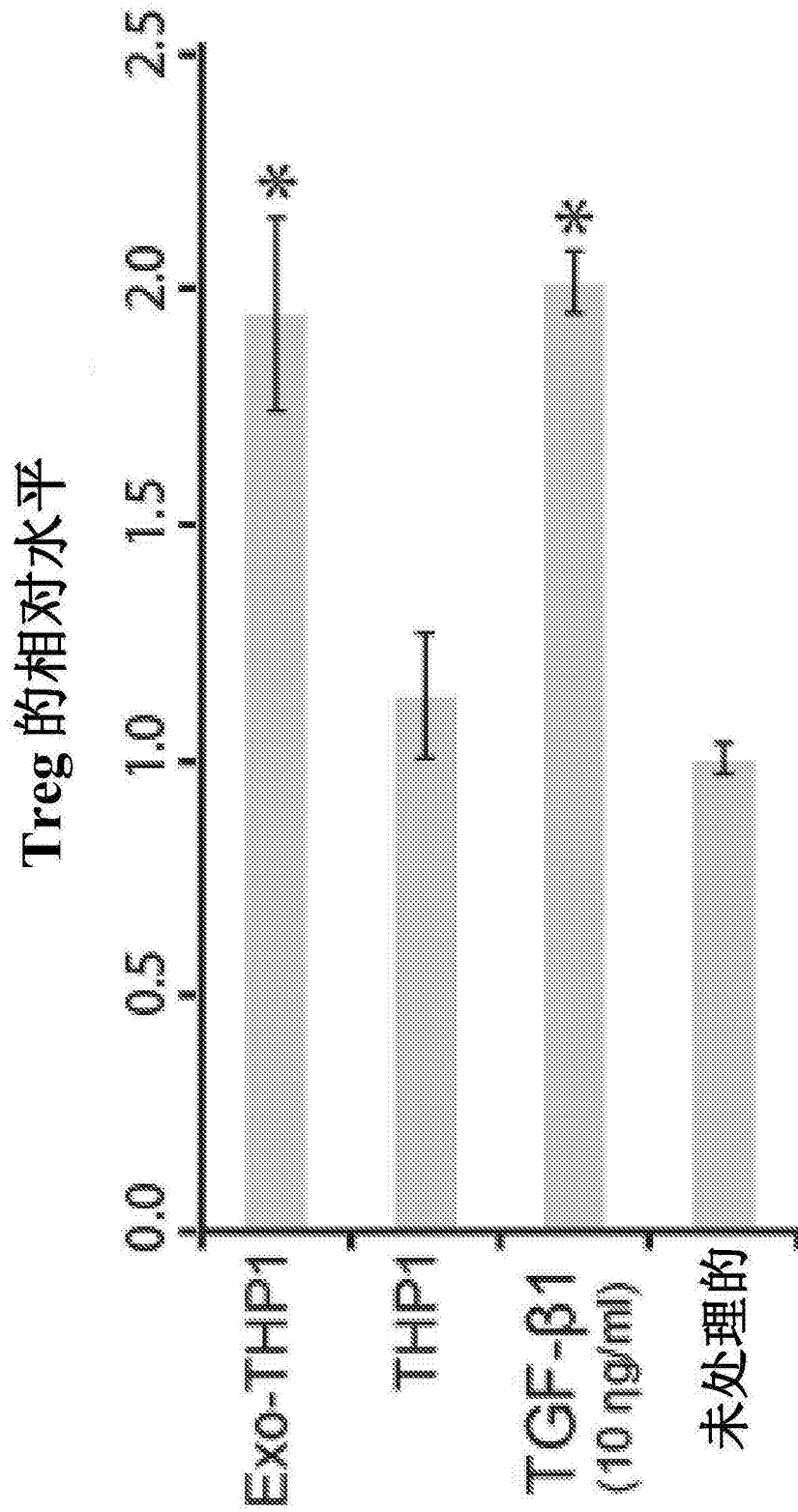


图12A

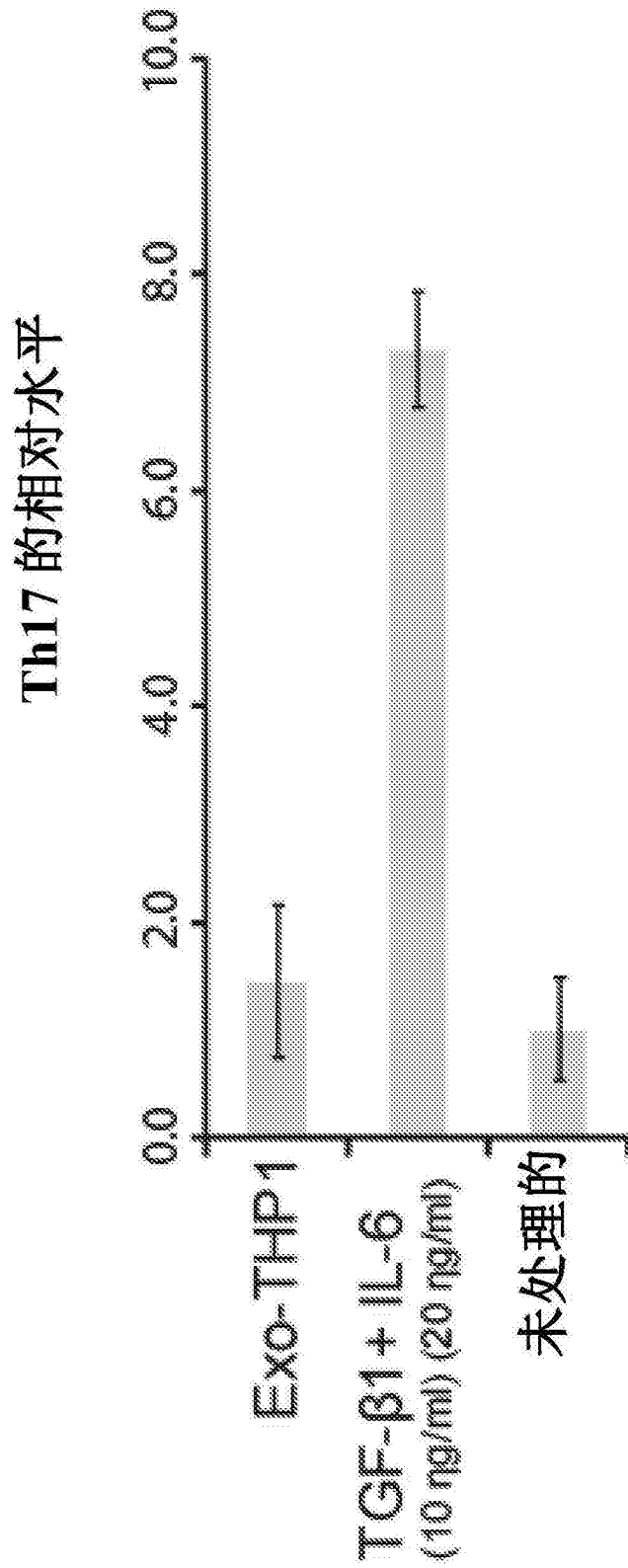


图12B

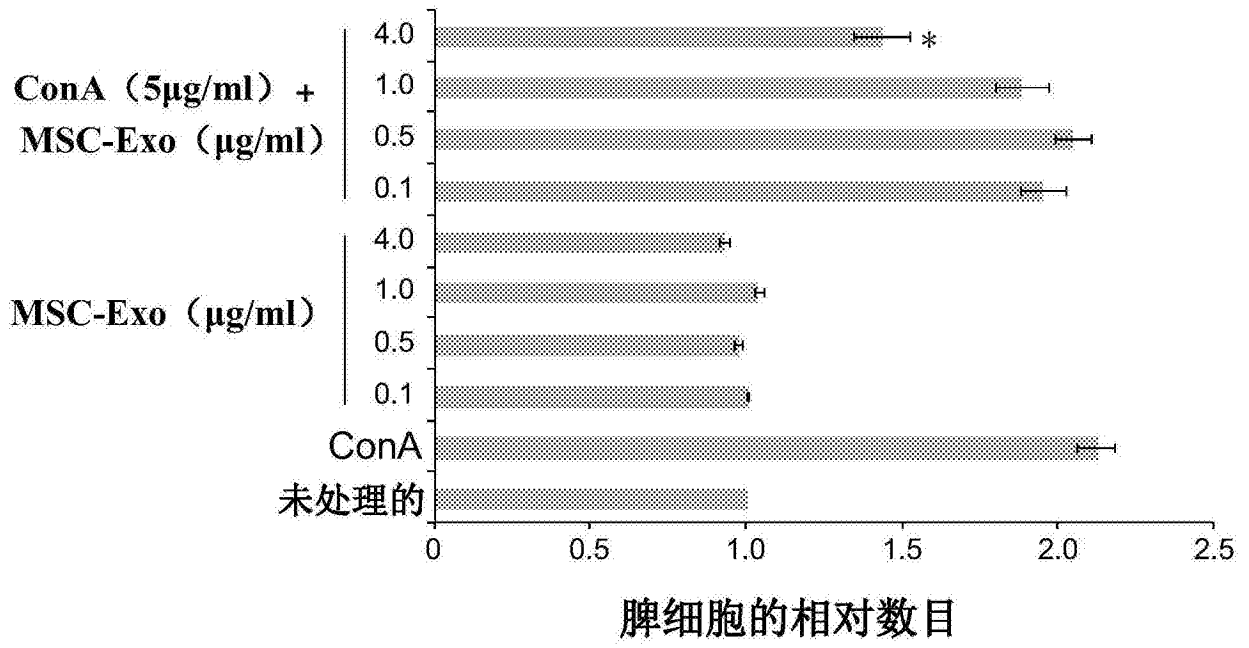


图13