(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105765059 B
(45)授权公告日 2021.05.25

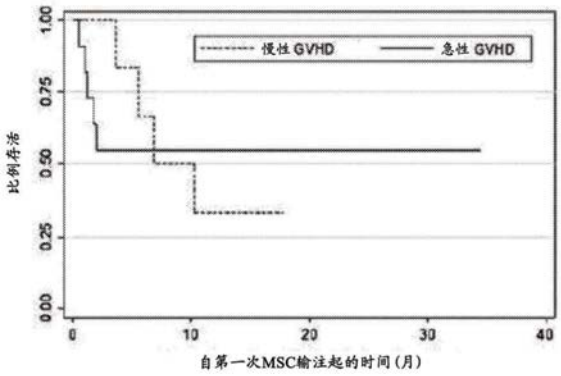
(21)申请号 201480064673.1
(22)申请日 2014.11.03
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105765059 A
(43)申请公布日 2016.07.13
(30)优先权数据
2013904257 2013.11.04 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.05.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2014/001031 2014.11.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/061839 EN 2015.05.07
(73)专利权人 伊索波根控股公司
地址 澳大利亚西澳大利亚州
(72)发明人 M·J·斯特姆
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴
(51)Int.Cl.
C12N 5/02(2006.01)
C12N 5/071(2006.01)
C12N 5/0775(2006.01)
(56)对比文件
CN 101889079 B,2012.08.08
US 2005090002 A1,2005.04.28
Jeffrey L. Spees等.Internalized Antigens Must Be Removed to Prepare Hypoimmunogenic Mesenchymal Stem Cells for Cell and Gene Therapy.《MOLECULAR THERAPY》.2004,第9卷(第5期),
审查员 张艳青
权利要求书3页 说明书23页 附图3页

(54)发明名称

细胞培养方法

(57)摘要

本发明涉及用于生成适合于对需要治疗性细胞或组织处理的哺乳动物进行治疗性应用的细胞和组织组合物的方法。具体而言,本发明涉及培养供疗法中使用的细胞的方法,该方法包括(i)在包含第一血清、血清替代物和/或血清级分的第一细胞培养基中培养细胞的样品,并(ii)在收获供疗法中使用的细胞前,在包含第二血清、血清替代物和/或血清级分的第二细胞培养基中培养细胞。



CN 105765059 B

1.一种培养供疗法中使用的间充质基质细胞的方法,其包括下述步骤:

(i) 在包含第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分的第一细胞培养基中培养间充质基质细胞的样品直至所述细胞已经达到70%至90%汇合,所述第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分选自下组:胎牛血清(FCS)和热灭活的胎牛血清(HIFCS);并

(ii) 在收获供疗法中使用的细胞前,用包含第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分的第二细胞培养基替换所述第一细胞培养基,所述第二血清或第二血清级分与培养的所述细胞具有相同的物种起源,或者所述第二血清替代物复制相同的物种起源,并在收获所述细胞供治疗使用前将所述细胞培养20至36小时,所述第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分选自血清和血清清蛋白。

2.依照权利要求1的方法,其中步骤(ii)中在收获所述细胞之前培养所述细胞20小时,或21小时,或22小时,或23小时,或介于24小时和36小时之间。

3.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中在步骤(ii)中在收获所述细胞之前培养所述细胞介于24小时和36小时之间。

4.依照权利要求3的方法,其中在步骤(ii)中在收获所述细胞之前培养所述细胞24小时。

5.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中步骤(i)包括在所述第一细胞培养基中培养间充质基质细胞的样品介于18小时和72小时之间,然后用新鲜的第一细胞培养基替换所述培养基以进行继续的培养直至所述细胞已经达到70%至90%汇合。

6.依照权利要求5的方法,其中步骤(i)包括在所述第一细胞培养基中培养间充质基质细胞的样品介于18小时和72小时之间,然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗粘附细胞,用新鲜的第一细胞培养基替换所述培养基以进行继续的培养直至所述细胞已经达到70%至90%汇合。

7.依照权利要求5的方法,其中培养步骤(i)中的间充质基质细胞的样品直至所述细胞已经达到70%至85%汇合。

8.依照权利要求5的方法,其中培养步骤(i)中的间充质基质细胞的样品直至所述细胞已经达到85%汇合。

9.依照权利要求5的方法,其中步骤(i)包括每3-4天进行培养基更换直至所述细胞已经达到所述70%至90%汇合。

10.依照权利要求1或权利要求2的方法,还包括提供分离自供体的间充质基质细胞的样品。

11.依照权利要求1或权利要求2的方法,还包括收获在步骤(ii)中培养的细胞的步骤。

12.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中所述间充质基质细胞不是胚胎的细胞。

13.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中所述间充质基质细胞是骨髓细胞。

14.依照权利要求13的方法,其中所述间充质基质细胞已经自骨髓抽吸物中分离。

15.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中所述间充质基质细胞是间充质祖细胞(MPC)。

16.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中所述细胞的样品自人、骆驼、马、犬和猫分离。

17.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中步骤(i)中的所述第一培养基包含选自下

组的基础培养基:DMEM、Eagle氏基础培养基、Ham氏F10培养基、Ham氏F-12培养基、Iscove氏改良的Dulbecco氏培养基、M-199、间充质干细胞生长培养基、Liebovitz氏L-15培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI 1640、Advanced DMEM、DMEM/MCDB201、和CELL-GRO FREE或其组合。

18.依照权利要求17的方法,其中所述基础培养基是DMEM。

19.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中步骤(i)中的所述细胞的样品包含介于每cm^2培养容器1.0 x 10^3个细胞和每cm^2培养容器1.0 x 10^{10}个细胞之间。

20.依照权利要求19的方法,其中步骤(i)中的所述细胞的样品包含介于每cm^2培养容器1.0 x 10^3个细胞和每cm^2培养容器1.0 x 10^7个细胞之间。

21.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中培养步骤(i)中的所述细胞的样品,直至所述细胞已经达到80%至90%汇合。

22.依照权利要求1或权利要求2的方法,其中步骤(ii)中的所述第二培养基包含选自下组的基础培养基:DMEM、Eagle氏基础培养基、Ham氏F10培养基、Ham氏F-12培养基、Iscove氏改良的Dulbecco氏培养基、M-199、间充质干细胞生长培养基、Liebovitz氏L-15培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI 1640、Advanced DMEM、DMEM/MCDB201、和CELL-GRO FREE或其组合。

23.依照权利要求22的方法,其中所述基础培养基是无酚红的DMEM。

24.依照权利要求22的方法,其中所述细胞是人间充质基质细胞,并且所述基础培养基补充有人血清或人血清清蛋白。

25.依照权利要求24的方法,其中所述人血清或人血清清蛋白是2% v/v。

26.依照权利要求2的方法,其包括:

(i) 在包含选自胎牛血清(FCS)和热灭活的胎牛血清(HIFCS)的第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分的第一细胞培养基中培养分离自哺乳动物的间充质基质细胞的样品介于18小时和72小时之间,然后用新鲜的第一细胞培养基替换所述培养基以进行继续的培养直至所述细胞已经达到70%至90%汇合;和

(ii) 在收获供疗法中使用的细胞前,用包含第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分的第二细胞培养基替换所述第一细胞培养基,所述第二血清或第二血清级分与培养的所述细胞具有相同的物种起源,或者所述第二血清替代物复制相同的物种起源,所述第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分选自血清和血清清蛋白;以及将所述细胞培养20小时,或21小时,或22小时,或23小时,或介于24小时和36小时之间。

27.一种培养供细胞疗法中使用的人间充质基质细胞的方法,其包括下述步骤:

(i) 在包含补充有热灭活的胎牛血清(HIFCS)的DMEM的第一细胞培养基中培养人间充质基质细胞,直至所述细胞达到70-85%汇合;以及

(ii) 在收获供疗法中使用的细胞前,除去所述第一细胞培养基并用包含无酚红的DMEM和2%人血清清蛋白的第二细胞培养基替换,然后将所述细胞再培养20小时,或21小时,或22小时,或23小时,或介于24小时和36小时之间。

28.一种培养供细胞疗法中使用的人间充质基质细胞的方法,其包括下述步骤:

(i) 在包含补充有热灭活的胎牛血清(HIFCS)的DMEM的第一细胞培养基中培养介于每cm^2培养容器1.0 x 10^3个细胞和每cm^2培养容器1.0 x 10^{10}个细胞之间的人间充质基质细胞,直至所述细胞达到70-85%汇合;以及

(ii) 在收获供疗法中使用的细胞前,除去所述第一细胞培养基并用包含无酚红的

DMEM和2%人血清清蛋白的第二细胞培养基替换，然后将所述细胞再培养20小时，或21小时，或22小时，或23小时，或介于24小时和36小时之间。

29.一种用于制备用于患者中同种细胞疗法的间充质基质细胞的方法，其包括下述步骤：

(i) 提供来自健康供体的间充质基质细胞的样品；

(ii) 在包含第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分的第一细胞培养基中培养所述细胞的样品直至所述细胞已经达到70%至90%汇合，所述第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分选自下组：胎牛血清(FCS)和热灭活的胎牛血清(HIFCS)；以及

(iii) 在收获供疗法中使用的间充质基质细胞前，用包含第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分的第二细胞培养基替换所述第一细胞培养基，所述第二血清或第二血清级分与培养的所述细胞具有相同的物种起源，或者所述第二血清替代物复制相同的物种起源，并将所述细胞培养20小时，或21小时，或22小时，或23小时，或介于24小时和36小时之间，所述第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分选自血清和血清清蛋白；以及

(iv) 收获所述细胞。

30.依照权利要求1或权利要求2的方法，其中在步骤(ii)之后所述培养的细胞表达一种或多种选自下组的细胞表面标志物：CD54、CD61、CD140A和CD201。

31.一种供细胞疗法中使用的组合物，其包含通过依照权利要求1或权利要求2的方法生成的细胞。

32.依照权利要求31的供细胞疗法中使用的组合物，其中所述细胞具有与在含有胎牛血清的培养基中生长的细胞相比升高的一种或多种选自下组的细胞表面标志物的表达：CD54、CD61、CD140A和CD201。

33.依照权利要求31或32的组合物，其中所述细胞在注射器中或在可收缩容器中悬浮。

34.依照权利要求31或32的组合物，其中所述细胞在适合于对患者治疗性施用的培养基中悬浮。

35.一种试剂盒，其包含通过依照权利要求1或权利要求2的方法产生的间充质基质细胞。

36.依照权利要求35的试剂盒，其另包含用于所述细胞在疗法中使用的说明书。

37.间充质基质细胞在制备用于细胞疗法中的药物中的用途，其中所述间充质基质细胞通过进行依照权利要求1或权利要求2的方法而产生。

38.一种可植入医学装置，其包含通过进行依照权利要求1或权利要求2的方法而产生的间充质基质细胞。

细胞培养方法

[0001] 领域

[0002] 本发明涉及用于细胞和组织疗法的新颖且改善的方法和组合物。本发明涉及用于生成细胞和组织组合物的方法，所述细胞和组织组合物适合于对需要治疗性细胞或组织处理的哺乳动物的治疗性应用。

[0003] 背景

[0004] 细胞疗法是一种用于几类病症、损伤、恶性和疾病的越来越重要的治疗。细胞疗法牵涉对患者输注、应用或移植细胞，其中输注、应用或移植的细胞自与患者不同的供体(同种)或自患者自身(自体)衍生。间充质基质细胞(MSC)是已经在治疗性用途方面显示希望的一种细胞类型。

[0005] 尽管它们有希望，至今用MSC获得的临床结果一般已经是较差的。这些较差临床结果的主要原因似乎是由于生成MSC的方式。例如，大多数MSC在胎牛血清中培养，然后仅通过清洗收获后的细胞除去所述胎牛血清。然而，此简单清洗不能除去附着于细胞表面的牛蛋白质或位于细胞内，后来可以掺入外部细胞表面中的那些牛蛋白质。在植入后，这些细胞然后会对其血液中存在针对牛蛋白质的抗体的患者(发生率约40-50％澳大利亚群体)表现为外来的，被患者的免疫系统识别并且在投递其治疗益处前破坏。

[0006] 如此，不断需要生成用于细胞疗法的细胞的方法。

[0007] 概述

[0008] 本发明人已经发现了可以以如下的方式生成细胞，使得改善或解决目前生成方法的问题，其已经导致增强的临床结果。

[0009] 因而，在第一个方面中，本发明提供了培养供疗法中使用的细胞的方法，其包括下述步骤：

[0010] (i)在包含第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分的第一细胞培养基中培养细胞样品达足够的时间以使所述细胞能够实现期望水平的扩充；并

[0011] (ii)在收获供疗法中使用的细胞前，用包含第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分的第二细胞培养基替换所述第一细胞培养基，并且将所述细胞再培养一段时间。

[0012] 在第二个方面中，本发明提供了培养供细胞疗法中使用的人间充质基质细胞的方法，其包括下述步骤：

[0013] (i)在包含补充有热灭活的胎牛血清(HIFCS)的DMEM的第一细胞培养基中培养间充质基质细胞，直至所述细胞达到约70-85％汇合；并

[0014] (ii)在收获供疗法中使用的细胞前约24小时，除去所述第一细胞培养基并用包含无酚红的DMEM和约2％人血清清蛋白的第二细胞培养基替换，然后将所述细胞再培养约24小时。

[0015] 在第三个方面中，本发明提供了培养供细胞疗法中使用的人间充质基质细胞的方法，其包括下述步骤：

[0016] (i)在包含补充有热灭活的胎牛血清(HIFCS)的DMEM的第一细胞培养基中培养介于每cm^2培养容器1.0x 10^3个细胞和每cm^2培养容器1.0x 10^{10}个细胞之间的间充质基质细

胞，直至所述细胞达到约70-85％汇合；并

[0017] (ii)在收获供疗法中使用的细胞前约24小时，除去所述第一细胞培养基并用包含无酚红的DMEM和约2％人血清清蛋白的第二细胞培养基替换，然后将所述细胞培养所述约24小时。

[0018] 在第四个方面中，本发明提供了用于制备供患者中的同种细胞疗法用的细胞的方法，其包括下述步骤：

[0019] (i)提供来自健康供体的细胞样品；

[0020] (ii)在包含第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分的第一细胞培养基中培养所述细胞样品达足够的时间以使所述细胞能够实现期望水平的扩充；并

[0021] (ii)在收获供疗法中使用的细胞前，用包含第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分的第二细胞培养基替换所述第一细胞培养基，并且将所述细胞再培养一段时间；并

[0022] (iv)收获所述细胞。

[0023] 本领域技术人员会领会，方法的步骤(i)需要细胞样品代谢、在细胞数目上扩充或增殖，直至容纳细胞的培养容器达到要收获的汇合水平。如此，包括培养基的培养条件应当足以容许培养的细胞的最佳扩充。

[0024] 在一些实施方案中，第一细胞培养基中的优选血清是胎牛血清(FCS)或热灭活的胎牛血清(HIFCS)。然而，会领会可以使用营养物、激素和蛋白质的其它来源替代包含血清清蛋白的FCS，所述血清清蛋白是FCS的主要组分。还有，其它血清替代物，诸如血小板裂解物和商业产品，诸如Ultroser™ G血清替代物(Pall Corporation，NY，USA)；含有Iscove氏MDM中的人血清清蛋白、胰岛素和转铁蛋白的HIT™血清替代物(Stemcell Technologies，BC，Canada)；血清替代物补充物(Serum Substitute Supplement)™(SSS™)构成6％总蛋白质：含有约84％人血清清蛋白、16％α和β球蛋白和＜1％γ球蛋白(Irvine Scientific，CA，USA)和Quinns Advantage® 血清蛋白质替代物(CooperSurgicalInc，CT，USA)。所有这些血清替代物提供正确的渗透势、生长因子和营养物/蛋白质以使细胞样品能够粘着于培养容器并且在细胞数目上扩充。

[0025] 在一些实施方案中，第一细胞培养基包含血清级分，诸如血清清蛋白。

[0026] 第二培养基包含与培养的细胞具有相同物种起源的第二血清或第二血清级分。例如，若在培养人细胞，则第二培养基会包含人血清、人血清替代物或人血清清蛋白。若在培养马细胞，则第二培养基会包含马血清、马血清替代物或马血清清蛋白。类似地，若培养犬细胞，则第二培养基会包含犬血清等。

[0027] 本领域技术人员会领会，细胞样品可以包括可以供细胞疗法中使用的任何细胞，包括同种和自体肝细胞、同种和自体造血细胞、同种和自体成纤维细胞、同种和自体脂肪细胞、同种和自体间充质细胞、同种和自体心肌细胞、同种和自体内皮细胞、同种和自体上皮细胞、同种和自体神经元细胞、同种和自体神经胶质细胞、同种和自体内分泌细胞或其祖细胞。

[0028] 优选地，本发明的细胞是间充质祖细胞，特别是间充质基质细胞(MSC)。

[0029] 应当理解，可以对任何哺乳类动物中的细胞疗法使用本发明的方法和组合物。因而，可以自人、骆驼、马、犬和猫或任何其它商业或经济上有价值的哺乳类动物分离细胞样

品。

[0030] 本领域技术人员会领会在含有如上文讨论的第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分的同时，第一培养基还会包含基础培养基。存在有本领域中已知的许多基础培养基，但是优选的基础培养基可以选自下组：DMEM(高或低葡萄糖)、Eagle氏基础培养基(MEM)、Ham氏F10培养基(F10)、Ham氏F-12培养基(F12)、Iscove氏改良的Dulbecco氏培养基、M-199、间充质干细胞生长培养基(MSCGM)、Liebovitz氏L-15培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI1640、Advanced DMEM(Gibco)、DMEM/MCDB201(Sigma)、和CELL-GRO FREE或其组合。优选地，第一基础培养基是DMEM。

[0031] 优选地，第一基础培养基补充有热灭活的胎牛血清(HIFCS)。

[0032] 细胞或组织培养方法是本领域中公知的标准方法。这些包括温度范围(例如约37℃)、CO_2浓度(例如10％CO_2)等。还有，细胞样品中的细胞量会大致是标准细胞培养规程中使用的那些量。例如，在一些实施方案中，细胞样品中的细胞数目会介于每cm^2培养容器1.0x 10^3个细胞和每cm^2培养容器1.0x 10^{10}个细胞之间。此细胞数目会相当于大致每80cm^2组织培养烧瓶12x10^6或每175cm^2组织培养烧瓶28x 10^6。

[0033] 在一些实施方案中，培养优选方法的步骤(i)中的细胞样品，直至细胞是约85％汇合。本领域技术人员会领会这可以包括第一基础培养基的定期更换以使培养基保持新鲜。在此阶段时，将细胞进一步加工，例如发明方法的步骤(ii)或传代。

[0034] 若要收获细胞以供细胞疗法中使用，则除去第一培养基，并且用第二培养基替换。在收获细胞以供细胞疗法中使用前至少12小时实施步骤(ii)。优选地，在收获细胞以供细胞疗法中使用前至少18小时实施步骤(ii)。甚至更优选地，在收获细胞以供细胞疗法中使用前至少24小时实施步骤(ii)。

[0035] 还会领会，不能容许细胞与第二培养基保持接触长于约48小时，因为细胞会开始变得衰老。因而，在一些实施方案中，在收获细胞以供细胞疗法中使用前约24小时和约36小时之间实施步骤(ii)。

[0036] 在一些方面中，会在存在第二培养基的情况中培养步骤(ii)中的细胞达12、13、14、15、16、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47和48小时。

[0037] 步骤(ii)中的第二培养基通常包含选自下组的基础培养基：DMEM(高或低葡萄糖)、Eagle氏基础培养基(MEM)、Ham氏F10培养基(F10)、Ham氏F-12培养基(F12)、Iscove氏改良的Dulbecco氏培养基、M-199、间充质干细胞生长培养基(MSCGM)、Liebovitz氏L-15培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI1640、Advanced DMEM(Gibco)、DMEM/MCDB201(Sigma)、和CELL-GRO FREE或其组合。优选地，第二基础培养基是无酚红的DMEM。

[0038] 在一些实施方案中，第二基础培养基补充有人血清或人血清清蛋白。虽然第二培养基中使用的人血清或人血清清蛋白的量不受限制，即可以使用任何量的血清，在一些实施方案中，人血清或人血清清蛋白的量是约2％。

[0039] 本领域技术人员会领会，可以在同种或自体背景中对细胞使用本发明的方法。在同种背景中，供体和接受者可以是或不是匹配的。

[0040] 在第五个方面中，本发明提供了供细胞疗法中使用的组合物，其包含通过依照方面1至4中任一项的方法生成的细胞。

[0041] 在一些实施方案中，细胞具有包含＞90％CD73、＞90％CD90、＞90％CD105表达和＜5％CD34、＜5％CD45、＜5％CD14表达的表型。在别的实施方案中，细胞具有包含CD54、CD61、CD89、CD140A和CD201表达的表型。CD54、CD61、CD89、CD140A和CD201的表达相对于已经在除了如本文中描述的本发明的方法外的方法中培养的人间充质基质细胞是增加的。

[0042] 本领域技术人员会领会，可以在一批投递装置中提供细胞。例如，在一些实施方案中，在注射器中悬浮细胞，而在其它实施方案中，在可收缩容器中悬浮细胞。优选地，在适合于对患者的治疗性施用的培养基中悬浮细胞。

[0043] 在第六个方面中，本发明提供了细胞疗法的方法，其包括

[0044] (i)提供来自健康供体的细胞样品；

[0045] (ii)在包含第一血清、第一血清替代物和/或第一血清级分的第一细胞培养基中培养所述细胞样品达足够的时间以使所述细胞能够实现期望水平的扩充；并

[0046] (ii)在收获供疗法中使用的细胞前，用包含第二血清、第二血清替代物和/或第二血清级分的第二细胞培养基替换所述第一细胞培养基，并且将所述细胞再培养一段时间；并

[0047] (iv)收获所述细胞；并

[0048] (v)对有此需要的患者植入或施用所述细胞。

[0049] 本领域技术人员会领会，一旦生成了本发明的扩充的细胞，可以贮存它们以供后来使用。此外，可以以试剂盒的形式提供扩充的细胞，所述试剂盒包含细胞样品和相关试剂，诸如培养基，和用于培养和使用的指令。

[0050] 因而，在第七个方面中，本公开内容提供了试剂盒，其包含通过第一个方面的方法生成的扩充的细胞群体。

[0051] 在一些实施方案中，可以在单层或3维培养物中温育本发明的细胞。为了获得3维培养物，本领域技术人员会领会可以使用合适的支架。合适的支架包括Vitrogen™，一种胶化以形成细胞定殖性基质的含有胶原的溶液，和Hwang(美国专利申请No.20040267362)、Kladaki等(美国专利申请No.20050177249)和Binette等(美国专利申请No.20040078077)的结缔组织支架。

[0052] 也可以对医学装置的极其多种接触表面之任一应用本发明的细胞。接触表面包括但不限于意图接触动物(包括尤其是人)的血液、细胞或其它体液或组织的表面。合适的接触表面包括意图接触血液或其它组织的医学装置的一个或多个表面。医学装置包括动脉瘤线圈(aneurysm coils)、人工血液容器、人工心脏、人工瓣膜、人工肾、人工腱和韧带、血液袋、血液氧合器、骨和心血管置换物、骨假肢、骨蜡、心血管嫁接物、软骨置换装置、导管、微珠、神经生长引导(nerve-growth guides)、眼植入物、矫形植入物、假体、分流器、支架、创伤覆盖物、创伤愈合装置和本领域中已知的其它医学装置。

[0053] 接触表面可以包括网孔、线圈、导线、充气气囊或能够在靶位置处植入的任何其它结构，包括血管内位置、腔内(intralumenal)位置、实体组织内的位置，等等。可植入装置可以意图用于永久或短暂植入。可以通过血管内和其它医学导管投递此类装置或者可以将此类装置掺入血管内和其它医学导管中。

[0054] 因而，在第八个方面中，本发明提供了医学装置，其包含通过第一个方面的方法生成的扩充的细胞群体。

[0055] 在第九个方面中，本发明提供了人间充质基质细胞在制备可用于细胞疗法的药物中的用途，其中如下生成所述人间充质基质细胞：

[0056] (i)在包含补充有热灭活的胎牛血清(HIFCS)的DMEM的第一细胞培养基中培养所述间充质基质细胞，直至所述细胞达到约70-85％汇合；

[0057] (ii)在收获供疗法中使用的细胞前约24小时，除去所述第一细胞培养基并用包含无酚红的DMEM和约2％人血清清蛋白的第二细胞培养基替换，然后将所述细胞再培养约24小时；

[0058] (iii)在适合于对患者治疗性施用的药学可接受培养基、稀释剂或载剂中收获所述间充质基质细胞。

[0059] 在第十个方面中，本发明提供了用于体外培养供人疗法中使用的人间充质基质细胞的细胞培养基，该培养基包含下述量的人血清或人血清清蛋白，所述量足以容许相对于不在存在人血清或人血清清蛋白的情况中培养的人间充质基质细胞而言在人间充质基质细胞表面上一种或多种粘着标志物的表达增加。

[0060] 在一些实施方案中，具有增加的表达的细胞表面标志物选自下组：CD54、CD61、CD89、CD140A和CD201。

[0061] 在第十一个方面中，本发明提供了体外培养的人间充质基质细胞，该细胞在其细胞表面上表达一种或多种选自下组的标志物：CD54、CD61、CD89、CD140A和CD201，其中比天然存在的间充质基质细胞优先表达所述标志物。

[0062] 附图简述

[0063] 图1：保险统计存活，自第一次MSC输注起的时间。

[0064] 图2a：按响应计的保险统计存活，急性病例和自第一次MSC输注起的时间。

[0065] 图2b：按响应计的保险统计存活，慢性病例和自第一次MSC输注起的时间。

[0066] 图3：在研究期里的均值克罗恩(Crohn)氏病活性指数(CDAI)。

[0067] 图4：MSC治疗之前和之后的克罗恩氏病活性指数(CDAI)。

[0068] 发明优选实施方案的描述

[0069] 在详细描述本发明前，应当理解本发明不限于具体例示的生成方法，其当然可以有所变化。还应当理解，本文中使用的术语是仅为了描述本发明的具体实施方案，并且不意图是限制性的，其仅会以所附权利要求书限制。

[0070] 在此通过提及完整收录本文中(无论上文或下文)引用的所有出版物、专利和专利申请。然而，为了描述和公开出版物中报告并且可以结合本发明使用的方案和试剂而引用本文中提及的出版物。本文中的任何内容不应解释为承认凭借在先发明，本发明没有资格早于此类公开内容。

[0071] 此外，除非另有指示，本发明的实践采用本领域技术内的常规免疫学技术、细胞生物学和组织培养技术和医学技术。此类技术是熟练技术人员公知的，并且在文献中完全解释。见例如Coligan,Dunn,Ploegh,Speicher and Wingfield“Current Protocols in Protein Science”(1999)Volume I and II(John Wiley&Sons Inc.)；及Bailey,J.E.and Ollis,D.F.,Biochemical Engineering Fundamentals,McGraw-Hill Book Company,NY,1986;Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer and Walker,eds.,Academic Press,London,1987);Handbook Of Experimental Immunology,Volumes

I-IV(D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds.,1986);Cell Therapy:Stem Cell Transplantation,Gene Therapy,and Cellular Immunotherapy,by G.Morstyn& W.Sheridan eds,Cambridge University Press,1996;及Hematopoietic Stem Cell Therapy,E.D.Ball,J.Lister&P.Law,Churchill Livingstone,2000。

[0072] 必须注意,如本文中及所附权利要求书中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述/该”包括复数提及物,除非上下文另有明确叙述。如此,例如,提及“细胞”包括复数个此类细胞,并且提及“动物”指提及一种或多种动物,等等。除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然可以使用与本文中描述的那些材料和方法相似或等同的任何材料和方法实施或测试本发明,但是现在描述优选的材料和方法。

[0073] 在最广的方面之一中,本发明涉及培养供疗法中使用的细胞的方法。

[0074] 术语“培养”在本文中可互换使用,并且一般指用于在体外培养细胞的标准细胞和组织培养技术。标准技术包括但不限于用于获得细胞的分离技术、特定细胞类型的克隆和选择、不想要的细胞的选择性破坏(负选择)、基于混合群体中的差别细胞可凝集性的分离、冷冻-融化规程、混合群体中的细胞的差别粘附特性、过滤、常规和区带离心法、离心淘析(反向流动离心)、单位重力分离、反流分布、电泳和荧光激活细胞分选。关于克隆选择和细胞分离技术的综述,参见Freshney,Culture of Animal Cells.A Manual of Basic Techniques,第2版,A.R.Liss,Inc.,New York,1987,第11和12章,第137-168页。

[0075] 短语“细胞样品”或“本发明的细胞”指为了培养以及然后疗法而分离或供应细胞。由于可以对任何哺乳类动物细胞使用本发明的方法,可以自任何哺乳类动物物种分离细胞样品,所述哺乳类动物物种包括但不限于人、骆驼、马、犬或猫或任何其它商业或经济上有价值的哺乳类动物。

[0076] 术语“分离的”指示它提及的细胞或细胞群体不在其天然环境内。细胞或细胞群体已经与周围组织实质性分开。在一些实施方案中,若样品含有至少约75%,在一些实施方案中至少约85%,在一些实施方案中至少约90%,和在一些实施方案中至少约95%细胞,则细胞或细胞群体与周围组织实质性分开。换言之,细胞样品与周围组织实质性分开,并且样品含有小于约25%,在一些实施方案中小于约15%,和在一些实施方案中小于约5%与细胞不同的材料。此类百分比数值指按细胞数目计的百分比。所述术语涵盖已经自它们起源的生物体取出,并且在培养物中存在的细胞。所述术语也涵盖已经自它们起源的生物体取出,并且随后再插入生物体中的细胞。含有再插入的细胞的生物体可以是取出细胞的相同生物体,或者它可以是不同生物体。

[0077] 本领域技术人员会领会,细胞样品可以包含可以供细胞疗法中使用的任何细胞,包括同种和自体肝细胞、同种和自体造血细胞、同种和自体成纤维细胞细胞、同种和自体脂肪细胞、同种和自体间充质细胞、同种和自体心肌细胞、同种和自体内皮细胞、同种和自体上皮细胞、同种和自体神经元细胞、同种和自体神经胶质细胞、同种和自体内分泌细胞或其祖细胞。

[0078] 在一些实施方案中,本发明的细胞是间充质祖细胞,特别是间充质基质细胞(MSC)。在一些实施方案中,MSC不是自胚胎材料生成的,但是包含成年间充质基质细胞。

[0079] 本发明的细胞群体也可以以细胞不以可检测水平表达标志物的特定选择为特征。

如本文中定义的，这些标志物被说成负标志物。

[0080] 在一些实施方案中，若分离的细胞群体的至少约70％细胞不应显示标志物的可检测表达，则认为本发明的细胞群体不表达标志物。在其它实施方案中，细胞群体的至少约80％、至少约90％或至少约95％或至少约97％或至少约98％或至少约99％或100％细胞不应显示标志物的任何可检测表达。再一次，可以经由使用RT-PCR实验或使用FACS证明可检测表达的缺乏。

[0081] 若在30个PCR循环的水平(其对应于每个细胞小于约100个拷贝的细胞中的表达水平)上不能合理检测表达，则认为本发明的细胞群体不表达上文描述的负标志物。

[0082] 在一个实施方案中，细胞群体进一步以细胞不以可检测水平表达标志物CD14、CD34和CD45中的一种、两种或所有三种为特征。如上文描述的，有可能不表达这些标志物，尽管有持续的少量残留的表达。

[0083] 本发明的细胞群体也可以以细胞不以可检测水平表达标志物的特定选择为特征。如本文中定义的，这些标志物被说成正标志物。

[0084] 在一些实施方案中，若分离的细胞群体的至少约70％细胞显示可检测的标志物表达，则认为本发明的细胞群体表达标志物。在其它实施方案中，细胞群体的至少约80％、至少约90％或至少约95％或至少约97％或至少约98％或至少约99％或100％细胞显示可检测的标志物表达。可以经由使用RT-PCR实验或使用FACS证明可检测的表达。

[0085] 若在30个PCR循环的水平(其对应于每个细胞多于约100个拷贝的细胞中的表达水平)上合理检测表达，则认为本发明的细胞群体表达上文描述的正标志物。

[0086] 在一个实施方案中，细胞群体进一步以细胞以可检测水平表达标志物CD73、CD90和CD105中的一种、两种或所有三种为特征。

[0087] 术语CD73包括CD73及其任何直向同系物，包括但不限于NT5E、5’-核苷酸酶、ecto、RP11-321N4.1、E5NT、NT、NT5、NTE、eN、eNT、5’核苷酸酶(CD73)、5’核苷酸酶、OTTHUMP00000040565、嘌呤5’-核苷酸酶、和外-5’-核苷酸酶。

[0088] 术语CD90包括CD90及其任何直向同系物，包括但不限于Thy-1，5E10。

[0089] 术语CD105包括CD105及其任何直向同系物，包括但不限于ENG、内皮糖蛋白(endoglin)、RP11-228815.2、END、FLJ41744、HHT1、ORW和ORW1。

[0090] 在一些实施方案中，细胞具有包含＞90％CD73、＞90％CD90、＞90％CD105表达和＜5％CD34、＜5％CD45、＜5％CD14表达的表型。

[0091] 在一些实施方案中，优选的细胞样品是自骨髓抽吸物分离的骨髓单核细胞。可以自收获针将骨髓抽吸物收集入肝素化的注射器中。若自收集至加工的时间会长于2小时，则优选地，冷却保存(2-8℃)骨髓，并且在24小时内开始加工。

[0092] 在一些实施方案中，通过密度梯度离心分离骨髓单核细胞，并且在PBS中清洗，之后在第一细胞培养基中重悬，并铺板。

[0093] 铺板的细胞数目会取决于细胞类型和培养容器的类型。然而，细胞数目通常会介于每cm^2培养容器1.0x 10^3个细胞和每em^2培养容器1.0x 10^{10}个细胞之间。在一些实施方案中，细胞数目相当于大致每80cm^2组织培养烧瓶12x10^6或每175cm^2组织培养烧瓶28x 10^6。

[0094] 短语“第一细胞培养基”在本文中用于指容许细胞样品代谢、扩充或在细胞数目上增殖，直至容纳细胞的培养容器达到要收获的汇合水平的标准培养基。

[0095] 术语“培养基”是本领域中公认的，并且一般指用于培养活细胞的任何物质或制备物。如提及细胞培养物使用的，术语“培养基”包括围绕细胞的环境的组分。

[0096] “第一细胞培养基”通常会包含第一基础培养基(例如商品化培养基)，诸如DMEM(高或低葡萄糖)、Eagle氏基础培养基(MEM)、Ham氏F10培养基(F10)、Ham氏F-12培养基(F12)、Iscove氏改良的Dulbecco氏培养基、M-199、间充质干细胞生长培养基(MSCGM)、Liebovitz氏L-15培养基、MCDB、DMEM/F 12、RPMI 1640、Advanced DMEM(Gibco)、DMEM/MCDB201(Sigma)、和CELL-GRO FREE或其组合。在一些实施方案中，第一基础培养基是DMEM。

[0097] “第一细胞培养基”通常还会包含第一血清、第一血清替代物、第一血清级分或其组合。术语“第一血清”包括商品化的血清来源，诸如胎牛血清(FCS)或热灭活的胎牛血清(HIFCS)。优选地，第一基础培养基补充有热灭活的胎牛血清(HIFCS)。

[0098] 术语“第一血清替代物”包括血小板裂解物和商业产品，诸如Ultroser™ G血清替代物(Pall Corporation,NY,USA)；含有Iscove氏MDM中的人血清清蛋白、胰岛素和转铁蛋白的HIT™血清替代物(Stemcell Technologies,BC,Canada)；血清替代物补充物™(SSS™)构成6％总蛋白质：含有约84％人血清清蛋白、16％α和β球蛋白和＜1％γ球蛋白(Irvine Scientific,CA,USA)和Quinns Advantage®血清蛋白质替代物(CooperSurgicalInc,CT,USA)。所有这些血清替代物提供正确的渗透势、生长因子和营养物/蛋白质以使细胞样品能够粘着于培养容器并且在细胞数目上扩充。

[0099] 术语“第一血清级分”包括血清组分，诸如血清清蛋白。

[0100] 一旦铺板第一细胞样品，在标准的细胞培养条件下温育细胞达足够的时间以扩充并达到需要的汇合水平。典型的一组细胞培养条件是约37℃、约5％CO_2和约70％湿度。

[0101] 短语“足够的时间”指细胞实现“期望水平的扩充”的时间长度。本领域技术人员应当理解，达到期望水平的扩充需要的时间会取决于某些因素，诸如细胞类型、最初的铺板细胞密度、第一细胞培养基的类型和最终使用疗法需要的细胞数目。然而，在一些实施方案中，将细胞温育介于18和72h之间，之后用PBS清洗粘附细胞，并且替换培养基以进行继续的培养。

[0102] 短语“期望水平的扩充”通常牵涉在每3-4天更换培养基的情况中培养细胞，直至细胞已经达到70至90％汇合的步骤。在一些实施方案中，可以在细胞房，诸如CellSTACK房(Corning,USA)中培养细胞。以约5,000个细胞/cm^2的典型细胞密度将细胞接种入这些房中。如下文描述的，供疗法中使用的细胞数目介于约1x 10^6个细胞/kg体重至约15x 10^6/kg体重之间。如此，对于80kg人，会需要总共约80x 10^6个细胞至1200x 10^6个细胞。如此，在一些实施方案中，短语“期望水平的扩充”意指培养细胞，直至已经生成期望的细胞体积，诸如80x 10^6个细胞至1200x 10^6个细胞。

[0103] 一旦细胞已经达到期望水平的扩充，可以制备细胞以进行收获。如本文中使用的，短语“在收获细胞前”指用“第二细胞培养基”替换“第一细胞培养基”。术语“在前”提及的时间段通常是收获细胞以供细胞疗法中使用前至少12小时。优选地，在收获细胞以供细胞疗法中使用前至少18小时实施此步骤。甚至更优选地，在收获细胞以供细胞疗法中使用前至少24小时实施步骤(ii)。如此，通常，除去第一细胞培养基，并用第二细胞培养基替换，然后于约37℃在含有5％CO_2的湿润培养箱中温育细胞约24h。还会领会，不能容许细胞与第二细胞培养基保持接触超过约48小时，因为细胞会开始变得衰老。

[0104] 会领会,短语“将细胞再培养一段时间”指如由术语“在前”涵盖的相同时间段。

[0105] 如本文中使用的,短语“第二细胞培养基”指包含选自下组的基础培养基的组织培养基:DMEM(高或低葡萄糖)、Eagle氏基础培养基(MEM)、Ham氏F10培养基(F10)、Ham氏F-12培养基(F12)、Iscove氏改良的Dulbecco氏培养基、M-199、间充质干细胞生长培养基(MSCGM)、Liebovitz氏L-15培养基、MCDB、DMEM/F12、RPMI 1640、Advanced DMEM(Gibco)、DMEM/MCDB201(Sigma)、和CELL-GRO FREE或其组合。优选地,第二基础培养基是无酚红的DMEM。

[0106] “第二细胞培养基”也会包含“第二血清”、“第二血清替代物”、“第二血清级分”或其组合。然而,至关重要的是,第二血清和/或第二血清级分与培养的细胞具有相同的物种起源。例如,若在培养人细胞,则第二培养基会包含人血清、人血清替代物或人血清清蛋白。若在培养马细胞,则第二培养基会包含马血清、马血清替代物或马血清清蛋白。类似地,若培养犬细胞,则第二培养基会包含犬血清等。

[0107] 在一些实施方案中,第二基础培养基补充有人血清或人血清清蛋白以在培养人细胞中使用。虽然第二培养基中使用的人血清或人血清清蛋白的量不受限制,即可以使用任何血清量,但是在一些实施方案中,人血清或人血清清蛋白的量是约2%。

[0108] 不希望受限于任何理论或假说,发明人认为在与起源物种不“匹配”的血清(例如用于人细胞的人血清,用于犬细胞的犬血清,等等)中培养供疗法用的细胞,生成的培养细胞表达表面标志物,其被患者的免疫系统被识别为“外来的”,这导致组织排斥问题和最终治疗失败。然而,在物种匹配血清(例如人血清)中过长培养细胞是(i)昂贵的,并且(ii)太慢地生成对于疗法足够的细胞。因而,优先的是在“标准”组织培养基(诸如DMEM和胎牛血清)中培养供疗法用的细胞,然后除去“第一细胞培养基”以用本发明的“第二细胞培养基”替换,这容许除去错误的细胞表面标志物。

[0109] 记住上文,应当注意到在第二细胞培养基中培养本发明的细胞的步骤后,细胞具有“一种或多种粘着标志物的表达增加”。术语“表达增加”指编码粘着标志物蛋白质的可检测mRNA的量或粘着标志物蛋白质本身的检测的增加。增加是相对于下述细胞上的这些粘着标志物的mRNA和/或蛋白质的检测水平,所述细胞尚未在存在第二细胞培养基的情况中培养或者更具体地已经在存在补充有胎牛血清的培养基,诸如第一细胞培养基中使用的培养基的情况中培养。用于测量mRNA和/或蛋白质增加的技术是本领域中公知的,并且参考上文。

[0110] 如本文中使用的,术语“收获”指收集供疗法中使用的扩充细胞的过程。可以使用用于自细胞培养烧瓶和房取出细胞的标准技术。例如,公知的是,可以使用胰蛋白酶以自塑料细胞培养烧瓶取出粘附细胞。一种优选的方法牵涉通过抽吸自细胞房除去第二细胞培养基;用PBS漂洗细胞;添加TrypLE™ Select(Life Technologies Inc,CA,USA);于37℃温育,直至所有细胞已经分离,通常在30min内,但小于1小时。然后,在培养基中分离细胞。然后,以450g(1500rpm)离心细胞5min,并且在合适的悬浮培养基中重悬,并计数。

[0111] 以适合于疗法的细胞数目在合适的悬浮培养基中的细胞构成如本文中定义的细胞疗法组合物。

[0112] “合适的悬浮培养基”会取决于疗法、施用路径、细胞类型等,但是通常,悬浮培养基是适合于静脉内使用的等张溶液。优选地,等张溶液进一步包含约2%HAS。

[0113] “合适的细胞数目”再一次依赖于进行的疗法、施用路径、细胞类型，等等。

[0114] 本领域技术人员会领会，一旦已经生成了本发明的扩充细胞，可以贮存它们以供后来使用。用于制备本发明的细胞以低温保存的技术会取决于细胞的最终使用。例如，若低温保存用于传代培养，则可以如上文所述在合适的培养基(例如补充有10％HIFBS和5μg/mL庆大霉素，和80％细胞培养基的相等体积的低温保存溶液的DMEM，例如补充有10％HIFBS和5μg/mL庆大霉素加20％DMSO(二甲亚砜)的DMEM)中收获细胞。或者，例如若低温保存用于未来患者施用，则可以在优选含有2％HAS的等张溶液中收获细胞，然后离心，并且除去上清液。然后，可以在等张溶液和相等体积的低温保存溶液中重悬细胞，所述低温保存溶液包含例如40％等张溶液、40％HSA(20％溶液)和20％DMSO。最初，冷却细胞至2-8℃，然后以受控速率冷冻至-160℃。

[0115] 用于融化细胞的规程会再次取决于最终用途。例如，融化要培养的细胞通常牵涉在预加热至36-40℃的含有无菌盐水的水浴中快速融化，直至刚好融化。然后，在PBS中清洗细胞，以450g(1500rpm)离心5min，并且在培养基中重悬以获得需要的细胞浓度。

[0116] 对于患者使用，在预加热至36-40℃的含有无菌盐水的水浴中快速融化低温保存的细胞，直至刚好融化。然后，用相等量的等张溶液稀释细胞，并且在融化的5小时内输注。

[0117] 如上文描述的，可以对同种或自体细胞使用本发明的方法。如此，在一些实施方案中，“供体”是匹配供体，而在其它实施方案中，“供体”不是匹配的。例如，供体可以与患者具有小于或等于50％组织匹配，但是在其它情况中，根本不会有匹配，即同种供体。

[0118] 在一些实施方案中，混合本发明的细胞与一种或多种药学可接受载剂。本文中采用短语“药学可接受”以指在合理医学判断的范围内适合于与人和动物的组织接触使用而没有过度毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症，与合适的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物、和/或剂量形式。

[0119] 如本文中使用的，短语“药学可接受载剂”意指牵涉将受试细胞从一种器官、或身体部分携带或转运至身体的另一种器官或部分的药学可接受材料、组合物或媒介物，诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包囊材料。在与施用的材料的其它成分相容并且对患者无害的意义上，每种载剂必须是“可接受的”。

[0120] 药学可接受载剂可以包含支持细胞存活力的细胞培养基。培养基通常会是无血清的，以避免在接受者中引起免疫应答。载剂通常会是缓冲的和/或无热原的。

[0121] 药学可接受载剂和稀释剂包括盐水、水性缓冲溶液、溶剂和/或分散介质。此类载剂和稀释剂的用途是本领域中公知的。优选地，溶液是无菌的并且在存在容易的可注射性的程度上流动。在许多实施方案中，溶液在制备和贮存的条件下是稳定的，并且经由使用例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞针对微生物(诸如细菌和真菌)的污染性作用提供保护。此列表仅作为例示提供，而并不意图是限制性的。可以通过在已经通过过滤灭菌的药学可接受载剂或稀释剂和需要时上文列举的其它成分中掺入如本文中描述的细胞制备作为本发明的细胞组合物的溶液。

[0122] 可以充当药学可接受载剂的材料和溶液的一些例子包括：(1)糖，诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2)淀粉，诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3)纤维素及其衍生物，诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；(4)粉状黄蓍胶；(5)麦芽；(6)明胶；(7)滑石；(8)赋形剂，诸如可可脂和栓剂蜡；(9)油，诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆

油;(10)乙二醇,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如丙三醇、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等张盐水;(18)林格(Ringer)氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;和(22)药物配制剂中采用的其它无毒性相容性物质。此列表仅作为例示提供,而并不意图是限制性的。

[0123] 一旦已经如本文中描述的那样制备了细胞,那么可以在疗法中使用它们以治疗患者。一般地,术语"治疗/处理"在本文中用于指影响个体或动物、其组织或细胞以获得期望的药理学和/或生理学效果。就状况和/或病症的部分或完全治愈而言,效果尤其是治疗性的。如本文中使用的,"治疗/处理"涵盖脊椎动物、哺乳动物,尤其是人中的状况和/或病症的任何治疗,并且包括:(a)抑制状况和/或病症,即停滞其形成;或者(b)缓解或改善状况和/或病症的症状。

[0124] 术语"状况"和/或"病症"在本文中可互换使用,并且指可以使用本发明的细胞治疗的影响动物(包括人)的异常状况。

[0125] 如贯穿整个说明书描述的,本发明的细胞特别可用于细胞疗法,包括体内诱导组织修复/再生。因此,本发明提供了治疗患者的方法,其中所述方法包括以合适的量对患者施用本发明的细胞。

[0126] 一般地,通过输注、注射或植入将本发明的细胞或其后代导入患者身体中。可以将细胞输注或直接注射或植入意图它们起作用的组织中。本发明的范围内包括含有本发明的细胞和药学可接受载剂的注射器。本发明的范围内包括对含有本发明的细胞和药学可接受载剂的注射器附着的导管。

[0127] 如上文讨论的,可以在组织的再生中使用本发明的细胞。为了实现此功能,可以将细胞直接注射或植入受损伤的组织中,在那里它们施加作用,可以增殖,并且最终依照其在身体中的位置,可以分化成需要的细胞类型。易于处理的组织包括所有受损伤的组织,特别包括那些可以已经受到疾病、损伤、创伤、自身免疫性反应,或者受到病毒性或细菌性感染损伤的。

[0128] 在一个实施方案中,会对动脉施用多种组合物的溶液、微球或微粒中的本发明的细胞或其后代,冲洗需要再生的受损器官的组织或部分。一般地,会使用导管实施此类施用。导管可以是用于血管成形术和/或细胞投递的极其多种气囊导管之一或者设计用于将细胞投递至身体的特定位置的特定目的的导管。虽然细胞对某些适应症的某些组织(例如心肌膜)展现出强向性,但是可以期望注意到对患者施用的大多数细胞不通过毛细管网络并且进入系统循环中。对于某些用途,可以将细胞包囊入由许多不同可生物降解化合物制成并且具有约15μm的直径的微球中。此方法可以容许血管内施用的细胞保留于损伤部位,并且在第一次传代中不通过毛细管网络并且进入系统循环中。在毛细管网络的动脉侧的保留也可以促进其移位入血管外空间中。

[0129] 在另一个实施方案中,可以将细胞逆行注射入血管树中,经由静脉以将它们投递至全身或者局部进入特定静脉中,所述特定静脉排入细胞被指引到的组织或身体部分中。对于此实施方案,可以使用上文描述的许多制剂。

[0130] 一个用于治疗心肌膜的备选实施方案是在具有或没有用系统,诸如Noga系统或任何类似注射系统的电定位的情况中经心内膜(transendocardically)经导管注射。

[0131] 在另一个实施方案中，可以将本发明的细胞或其后代植入粘着于生物相容性植入物的损伤组织中。在此实施方案内，可以在植入患者中前在体外使细胞粘着于生物相容性植入物。如本领域技术人员会清楚的是，可以在植入前使用许多粘着剂之任一种来使细胞粘着于植入物。仅举例而言，此类粘着剂可以包括血纤蛋白、整联蛋白家族的一种或多种成员、钙粘蛋白家族的一种或多种成员、选择蛋白家族的一种或多种成员、一种或多种细胞粘着分子(CAM)、一种或多种免疫球蛋白家族或一种或多种人工粘着剂。此列表仅作为例示提供，而并不意图是限制性的。对于本领域技术人员会清楚的是，可以使用一种或多种粘着剂的任何组合。

[0132] 在另一个实施方案中，可以在基质中包埋本发明的细胞或其后代，之后将基质植入患者中。一般地，会将基质植入患者的损伤组织中。基质的例子包括基于胶原的基质、基于血纤蛋白的基质、基于层粘连蛋白的基质、基于纤连蛋白的基质和人工基质。此列表仅作为例示提供，而并不意图是限制性的。

[0133] 在别的实施方案中，可以与基质形成组分一起将本发明的细胞或其后代植入或注射入患者中。这可以容许细胞在注射或植入后形成基质，从而确保细胞在患者内的适当位置处保留。基质形成组分的例子包括血纤蛋白胶液体烷基(fibrin glue liquid alkyl)、腈基丙烯酸盐(cyanoacrylate)单体、增塑剂、多糖，诸如右旋糖苷、含有环氧乙烷的寡聚物、嵌段共聚物诸如泊洛沙姆(poloxamer)和Pluronics、非离子表面活性剂诸如Tween和Triton`8`，和人工基质形成组分。此列表仅作为例示提供，而并不意图是限制性的。对于本领域技术人员会清楚的是，可以使用一种或多种基质形成组分的任何组合。

[0134] 在别的实施方案中，可以在微球内含有本发明的细胞或其后代。在此实施方案内，可以在微球的中心内包囊细胞。也在此实施方案内，可以将细胞包埋入微球的基质材料中。基质材料可以包括任何合适的可生物降解聚合物，包括但不限于藻酸盐、聚乙二醇(PLGA)和聚氨基甲酸酯。此列表仅作为例示提供，而并不意图是限制性的。

[0135] 在别的实施方案中，可以对意图用于植入的医学装置粘着本发明的细胞或其后代。此类医学装置的例子包括支架、销(pin)、缝线、分流器(split)、起搏器、假体关节、人工皮肤和杆。此列表仅作为例示提供，而并不意图是限制性的。对于本领域技术人员会清楚的是，可以通过多种方法将细胞粘着于医学装置。例如，可以使用血纤蛋白、整联蛋白家族的一种或多种成员、钙粘蛋白家族的一种或多种成员、选择蛋白家族的一种或多种成员、一种或多种细胞粘着分子(CAM)、一种或多种免疫球蛋白家族或一种或多种人工粘着剂将细胞粘着于医学装置。此列表仅作为例示提供，而并不意图是限制性的。对于本领域技术人员会清楚的是，可以使用一种或多种粘着剂的任何组合。

[0136] 在另一个实施方案中，可以将本发明的细胞施用入外周循环中，并且经由其对起源组织的向性，可以预期细胞会归巢至要治疗的器官/组织。

[0137] 如上文描述的，对于在医学中使用，会以治疗有效量对患者投递细胞。要在体内或离体投递的细胞数目可以基于许多参数，包括：患者的体重、组织损伤的严重性、和受试者内存活的细胞数目。典型的细胞数目可以是10^6至10^9个细胞左右。可以有必要重复输注、注射或植入细胞长达几年以实现必需的累积总质量和/或以替换死亡的细胞。一般地，在单一治疗方案中对患者投递的细胞的总数会大于约$1x\ 10^6$。然而，投递的细胞的总数可以高于$1x10^{10}$。患者或接受者通常会接受至少一剂细胞。优选地，患者或接受者会接受1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20剂或更多剂量。

[0138] 可以以单剂，在限定的时间段里以多剂，或者直至并且包括常规的长期维持剂量给药给予细胞。细胞剂量通常会是相隔分开的。例如，剂量可以是相隔1至2天或每周或每月。在一些实施方案中，剂量是每周一次持续4周。

[0139] 进一步在本发明内，在制备在组织再生或供细胞疗法中使用的药物中使用本发明的分离的细胞，包括但不限于克罗恩氏病、移植物抗宿主病、肝、神经系统的某些区域(诸如那些与帕金森(Parkinson)氏病有关的)和胰腺的再生。此类再生可以容许治疗帕金森氏病、II型糖尿病、慢性皮肤溃疡、和自身免疫性病症。也可以使用本发明的细胞治疗高等级原发性胶质瘤或较低等级复发性脑肿瘤，诸如胶质瘤，室管膜瘤、髓母细胞瘤或致畸性肿瘤、重度外周动脉疾病(severe peripheral arterial disease)、腱修复(tendon repair)、多发性骨髓瘤、白血病、角膜损伤、硬皮病、多发性硬化、系统性红斑狼疮(SLE)、血管炎、贝切特(Behcet)氏病、骨关节炎、软骨修复和类风湿性关节炎。此列表作为例示提供，而并不意图是限制性的。

[0140] 也可以对医学装置的极其多种接触表面之任一应用本发明的细胞。接触表面包括但不限于意图接触动物(包括尤其是人)的血液、细胞或其它体液或组织的表面。合适的接触表面包括意图接触血液或其它组织的医学装置的一个或多个表面。医学装置包括动脉瘤线圈、人工血液容器、人工心脏、人工瓣膜、人工肾、人工腱和韧带、血液袋、血液氧合器、骨和心血管置换物、骨假肢、骨蜡、心血管嫁接物、软骨置换装置、导管、接触镜、用于细胞和组织培养和再生的容器、栓塞颗粒(embolization particle)、过滤系统、嫁接物、引导通道、留置导管、实验室仪器、微珠、神经生长引导、眼植入物、矫形植入物、起搏器导联(pacemaker lead)、探头、假体、分流器、支架、用于肽的支持物、手术仪器、缝线、注射器、泌尿道置换物、创伤覆盖物、创伤包扎物、创伤愈合装置和本领域中已知的其它医学装置。

[0141] 会受益于本发明的应用的医学装置的其它例子对于手术和医学规程领域的技术人员会是容易明显的，并且因此由本发明涵盖。接触表面可以包括网孔、线圈、导线、充气气囊或能够在靶位置处植入的任何其它结构，包括血管内位置、管腔内位置、实体组织内的位置，等等。可植入装置可以意图用于永久或短暂植入。可以通过血管内和其它医学导管投递此类装置或者可以将此类装置掺入血管内和其它医学导管中。

[0142] 此外，扩充的细胞可以在含有个别包装治疗性商品的试剂盒、系统或规程包的形式中提供，并且可包括药物、医学装置和生物制品的组合。

[0143] “包括/包含”意指包括但不限于，无论什么接着词语“包括/包含”。如此，术语“包括/包含”的使用指示列出的要素是需要的或强制的，但是其它要素是任选的，并且可以存在或不存在。“由...组成”意指包括且限于，无论什么接着短语“由...组成”。如此，短语“由...组成”指示列出的要素是需要的或强制的，并且可以不存在其它要素。“基本上由...组成”意指包括该短语后列出的任何要素，并且限于其它不干扰或者促成列出的要素在公开内容中规定的活性或作用的要素。如此，短语“基本上由...组成”指示列出的要素是需要的或强制的，但是其它要素是任选的，并且可以存在或可以不存在，这取决于它们是否影响列出的要素的活性或作用。

[0144] 现在会通过仅参考以下非限制性实施例进一步描述本发明。然而，应当理解，以下实施例仅是例示性的，并且不应以任何方式理解为对上文描述的本发明的一般性的限制。

[0145] 实施例1:用于本发明的间充质基质细胞(MSC)的制备方法

[0146] 通过密度梯度离心分离骨髓单核细胞,并且在补充有10%胎牛血清(FBS)(SAFC Biosciences,Australia)的Duibecco氏改良的Eagle氏培养基(Invitrogen,Australia)(本发明的"第一细胞培养基"的代表性例子,如本文中描述的)中重悬清洗过的细胞,并且以每cm^2的160,000个细胞的密度铺板。

[0147] 于37℃在含有5%CO_2的湿润培养箱中维持培养物18-72h,之后用PBS(DKSH,Australia)清洗粘附细胞,并且替换新鲜的第一培养基以继续培养。在每3-4天更换培养基的情况下将细胞培养至80-90%汇合,然后使用TrypLE-Select(Invitrogen,Australia)传代,并且以5,000个细胞/em^2的密度在CellSTACK房(Coming,USA)中再接种。在扩充后,通常在传代2或3时,除去包含FBS的培养基,并且用补充有2%人血清清蛋白(HSA)(ARCBS)的无酚红的Duibecco氏改良Eagle氏培养基(Invitrogen,Australia)(本发明的"第二细胞培养基"的代表性例子,如本文中描述的)替换。然后,于37℃在含有5%CO_2的湿润培养箱中温育通过此方法生成的MSC达24h。然后,收获细胞,并且在10%二甲亚砜(WAK-Chemie,Germany)、50%Plasma-Lyte(BaxterHealth Care,Sydney,Australia)、20%氯化钠溶液和20%人血清清蛋白中施用或冷冻保存,并且于-196℃贮存。细胞扩充限于传代5,在最后一次传代时实施细胞遗传分析。制备细胞以容许1-10x 10^6个细胞/kg患者体重的剂量。

[0148] MSC视为可用于临床使用,只要它们满足下述发布标准:通过需氧和厌氧培养(Bactec plus aerobe/F和Bactec plus anaerobe/F,BD)对终产物的微污染测试呈阴性,通过锥虫蓝排斥的细胞存活力大于70%,并且存在有特征性MSC免疫表型(CD73、CD90和CD105的表达和CD45、CD34和CD14表达的缺乏)的表达,如通过使用FACS Diva软件在FACS Canto仪上的流式细胞术分析的。

[0149] 实施例2:细胞表面表达

[0150] 使用Becton Dickinson的BD Lyoplate™筛选小组实施细胞表面表型确定,所述筛选小组是可用于通过流式细胞术或生物成像对数百种鼠和人细胞表面标志物的有效序型分析的第一种广泛系统。通过遵循制造商的使用说明书使用小组。使用实施例1中描述的方法生成本发明的细胞,并且作为比较物,将MSC的其它样品培养与实施例1中相同的时间段,但是没有在存在人血清清蛋白的情况中的最终培养步骤。然后,经由高通量流式细胞术筛选242种标志物的表达,并且我们发现了许多细胞表面标志物是差异表达的。例如,与含有胎牛血清的培养基相比,CD54、CD61、CD89、CD140A和CD201在含有人血清清蛋白的培养基中培养的细胞中具有增加的表达。这些标志物主要是粘着标志物。

[0151] 实施例3:本发明的间充质基质细胞在用于类固醇难治性急性和慢性移植物抗宿主病的疗法中的用途

[0152] 在过去二十年里已经在了解移植物抗宿主病(GVHD)的生物学、及预防和治疗中做出了重大进展,导致二线药剂,诸如抗肿瘤坏死因子(TNF)和抗CD25生物制剂的引入。然而,类固醇难治性急性GVHD的预后仍然较差,20%左右的长期存活(Deeg,(2007),Blood,109(10):4119-26)。急性GVHD II-IV等级的发生率在同种造血干细胞移植(HSCT)后是约50%。标准治疗是用高剂量皮质类固醇,通常是甲泼尼龙(methylprednisolone)2mg/kg IV或口服等同物,其在30-40%左右的患者中诱导持久的完全响应(MacMillan et a1.,(2002),Biol Blood Marrow Transplant;8(7):387-94)。凭借类固醇难治性慢性GVHD(CGVHD),降

低长期存活,并且致残发病率是常见的。

[0153] 我们调查了通过实施例1的方法生成的MSC是否能够治疗类固醇难治性急性和慢性移植物抗宿主病。

[0154] 在2007年3月和2010年7月之间,签署知情同意的具有急性和CGVHD的患者有资格在单一机构1期安全性试验中接受MSC。研究得到皇家珀斯医院(Royal Perth Hospital)伦理委员会批准,并且由澳大利亚管理当局治疗性商品管理局(Therapeutics Goods Administration,TGA)授予临床试验通知(Clinical Trials Notification,CTN)。试验登记于澳大利亚和新西兰临床试验登记(ANZCTR12610000068066)。

[0155] 所有同种移植患者接受用钙依赖磷酸酶(calcineurin)抑制剂和4剂甲氨蝶呤针对AGVHD的防范。植入前条件化是14名患者中的骨髓消融的(myeloablative)和7名患者中的非骨髓消融的。造血干细胞来源是所有患者中动员的外周血细胞。

[0156] 若AGVHD II-IV级在用静脉内甲泼尼龙2mg/kg或口服泼尼松龙2.5mg/kg治疗7天后尚未能响应或进展,则年龄为18岁或之前的AGVHD患者有资格进行研究。通过共有评级(Przepiorka et al.(1995),Bone Marrow Transplant;15(6):825-8)评估AGVHD。所有患者继续类固醇疗法和钙依赖磷酸酶抑制剂和每周两次皮下用依那西普(etanercept)25mg的所有开始的伴随二线疗法。依那西普是一种可溶性二聚体TNFα受体2,其竞争TNF结合,并且使TNF无活性。AGVHD的活组织检查确认诊断是试验进入需要的。排除预期不能存活7天的具有不良表现状态的患者。

[0157] 尽管有泼尼松龙2.5mg/kg和钙依赖磷酸酶抑制剂,慢性GVHD患者具有广泛的疾病,并且通常接受麦考酚酯(mycophenolate),但是作为方案的一部分如此做不是需要的。它们依照NIH共有标准分类,主要靶器官具有2或更多的评分(Filipovich et al.,(2005),Biol.Blood Marrow Transplant;11(12):945-56)。

[0158] 试验的主要端点是安全性,并且次要端点是最佳响应和总体存活。对于AGVHD,完全响应是AGVHD的所有症状和体征的丧失,并且部分响应至少是一个等级或多个的改善。对于CGVHD,完全响应如对于AGVHD一样,并且部分响应是至少1的NIH共有评分的改善(Filipovich et al.,(2005),同上)。

[0159] 需要供体小于60岁龄,没有医学同患多病(comorbidity)并且签署知情同意。他们还必须具有阴性传染病标志物,如由关于血液和组织捐献的TGA要求的。

[0160] 在2007年1月和2010年6月之间登记19名患者,具有AGVHD的12名和具有CGVHD的7名。表1(对于AGVHD)和表2(对于CGVHD)中显示了患者特征和响应。

[0161]

表1：AGVHD受试者的特征和响应

患者，性别，年龄	供体	条件化	主要诊断	在第一次输注时自同种移植物起的时间（月）	MSC的来源	AGVHD的体征	AGVHD阶段（等级）	输注数	根据器官的响应（和PR的阶段）	结果
UPN 1, M, 21	MUD	Cy/TBI (M)	C ALL，复发	5	非HLA匹配	肝 皮肤 粘膜炎	1 3 4 (III)	19	肝CR 皮肤CR 粘膜炎CR	CR，关闭 免疫抑制
UPN 4, F, 23	MUD	Bu/Mel (M)	MDS	6	第三方	皮肤 口腔粘膜炎	3 4 (III)	5	皮肤CR 粘膜炎CR	CR 死于复发性败血症
UPN 6, M, 53	MUD	Flu/TBI (M)	CLL	1	第三方	皮肤 肠	4 3 (IV)	8	皮肤CR 肠PR(1)	死于病毒和 真菌性败血症
UPN 8, F, 29	MUD	Flu/Mel (M)	AML	1	第三方	皮肤	3 (III)	2	皮肤CR	CR
UPN 9, M, 56	MUD	Flu/Mel (NM)	NHL	5	第三方	皮肤 肠	2 2 (II)	2	皮肤CR 肠CR	CR
UPN 11, M, 58	MUD	Flu/Mel (NM)	AML	10	第三方	皮肤 肠	3 3 (III)	2	皮肤PR(1) 肠PR(1)	死于肠败血症
UPN 12, M, 61	MUD	Bu/Flu (NM)	RAEB2T	4	第三方	皮肤 肠	3 3 (IIII)	2	皮肤CR 肠PR(1)	死于肠败血症
UPN 13, F, 47	Sib	Bu/Mel (M)	继发性AML	1	第三方	皮肤 肠	3 3 (III)	2	皮肤CR 肠CR	CR
UPN 15, M, 25	MUD	Bu/Mel (M)	CML BC	4	第三方	肝 皮肤 肠	1 4 3 (IV)	2	肝CR 皮肤CR	CR
UPN 16, F, 47	Sib	Cy/TBI (M)	CLL	6	匹配同胞	肠 皮肤	2 4 (IV)	2	肠CR 皮肤CR	CR
UPN 17, M, 50	MUD	Bu/Mel (M)	PRV至MF	4	第三方	肠 肝	3 2 (III)	2	肠PR(1) 肝NR	死于出血性中风
UPN 18, M, 52	MUD	Flu/Mel (NM)	NHL	1	第三方	皮肤 粘膜炎	4 4 (IV)	2	皮肤NR 粘膜炎NR	NR 死于败血症

MUD匹配无关供体，Sib匹配同胞，Cy环磷酰胺，TBI总身体照射，Bu白消安(busulfan)，Mel美法仑(melphalan)，Flu氟达

[0162]

拉滨(fludarabine)，M骨髓消融，NM非骨髓消融，CALL常见的急性成淋巴细胞性白血病，MDS脊髓发育不良，CLL慢性成淋巴细胞性白血病，AML急性髓样白血病，NHL非何杰金氏淋巴瘤，RAEBT难治性贫血伴转化中胚细胞过多(refractory anaemia with excess of blasts in transformation)，CML BC胚细胞危象中的慢性髓样白血病(chronic myeloid leukaemia in blast crisis)，PRV真性红细胞增多症(polycythemia rubra vera)，MF骨髓纤维化，CR完全响应，PR部分

表2：CGVHD受试者的特征和响应

患者，性别，年龄	供体	条件化	主要诊断	在第一次输注时自同种移植物起的时间（月）	MSC的来源	CGVHD的体征和得分	输注数	根据器官的响应（在PR的情况中实现的得分）	结果
UPN 2, M, 51	Sib	Bu/Mel (M)	AML	63	Sib	O.B 3 KCS 2	8	O.B NR KCS PR(1)	复发性胸部感染和死亡
UPN 3, M, 50	Sib	Cy/TBI (M)	Ph + ALL	85	Sib	O.B 3 KCS 2	8	O.B NR KCS PR(1)	呼吸衰竭死亡
UPN 5, F, 36	MUD	Bu/Mel (M)	AML	89	Sib	皮肤2	7	皮肤CR	CR
UPN 7, M, 31	MUD	TBI/Mel (M)	AML	18	第三方	口腔粘膜炎3	8	CR	CR
UPN 10, M, 34	MUD	Bu/Mel (M)	ALL	14	第三方	口腔粘膜炎3	3	粘膜炎PR(2)	死于进行性白血病
UPN 14, F, 53	MUD	Flu/Mel (NM)	CML BC	27	单倍体儿子	O.B 2 皮肤2	2	O.B NR 皮肤PR(1)	死于胸部感染，呼吸衰竭
UPN 19, M, 48	Sib	Bu/Mel (M))	AML	20	第三方	肝3	11	肝NR	NR死于肝衰竭

MUD匹配无关供体，Sib匹配同胞供体，单倍体：单倍体相同，Bu白消安(busulfan)，Mel美法仑(melphalan)，Cy环磷酰胺，TBI总身体照射，AML急性髓样白血病，Ph + ALL费城(Philadelphia)阳性急性成淋巴细胞性白血病，CML BC胚细胞危象中的慢性髓样白血病，OB闭塞性细支气管炎(obliterative bronchiolitis)，KCS干燥性角结膜炎，CR完全响应，PR部分

[0163] 所有患者具有造血恶性。接受匹配无关供体移植物的患者代表具有AGVHD的12名中的10名和具有CGVHD的7名中的2名。

[0164] 最初，患者每周两次持续4周静脉内接受MSC的8次输注，在AGVHD的情况中作为住院患者或者对于CGVHD患者在每日中心中，并且监测输注相关反应。随后，在发表比较用于AGVHD的两剂MSC的随机化试验后(Kebriaeiet al.,2009)，Biol Blood Marrow Transplant.;15(7):804-11)，试验修改为以每周间隔的两次输注，并且以此为基础，9名患者接受输注。实现但不维持完全响应的患者有资格以每周间隔用两次输注再治疗。完全响应是GVHD的所有体征的丧失，部分响应改善一个等级，稳定疾病是无GVHD症状或体征的变化，并且进展是一个等级或多个的恶化。

[0165] 通过在每次输注后对患者观察4h，对生命体征监测输注反应评估安全性。在输注的随后访视时还对患者询问先前输注后的间隔期间经历的症状，并且以定期进行的随访监测不利事件。

[0166] 鉴于这是I期研究，我们将统计学方法限于描述方法，其指示分层为急性和慢性类别的患者的总体经历。存活描述为从第一次MSC输注起的时间。分别对急性和慢性病例使用Kaplan-Meier方法评估存活时间。使用非参数时序检验检查组间的存活差异，并且对排序组检查存活模式的趋势。

[0167] 自来自总共16名单倍体相同家庭成员或HLA不匹配的、相关的或无关的供体的骨髓抽吸物衍生用于此研究的MSC。依照实施例1中描述的方法制备MSC。

[0168] 对19名患者实施总共109次输注，每名患者具有2次输注的中值。两名患者需要进一步输注以用于AGVHD的复发，其中一名患者具有1个再输注事件，并且第二名在3年里接受7次输注。6名CGVHD患者在一个治疗事件中接受2次输注，并且1名CGVHD患者具有超过一个治疗事件，接受总共11次输注。除了几名患者中注意到的由于冷冻保护剂二甲亚砜所致的味觉的轻度异常外，输注是耐受良好的，没有急性输注相关毒性及没有记录随后可归因于MSC输注的毒性。

[0169] 表1(对于AGVHD)和表2(对于CGVHD)中显示了根据牵涉的器官的响应和总体响应。对于AGVHD的总体响应率在7名中是完全的，在4名中是部分的，并且在1名患者中无响应。所有没有完全响应的患者死亡:5名死于机会性感染，并且1名死于出血性中风。在7名实现完全响应的患者中，6名是存活的，并且1名死于细菌性败血症。

[0170] 两名CGVHD患者实现完全响应，而2名实现部分响应，并且3名没有响应。在此组中有5例死亡，3名死于与胸部感染有关的进行性闭塞性细支气管炎，1名死于由于CGVHD所致的肝衰竭，并且1名死于复发性急性成淋巴细胞性白血病。图1中显示了这两个组的保险统计存活，急性组具有55％的3年存活，并且对于CGVHD具有8个月的中值存活。在AGVHD中，完全响应对于存活是重要的。时序检验显示了响应是急性GVHD患者($x^2=11.3$,$p=0.0008$)(图2a)，而非对于慢性病例($x^2=2.79$,$p=0.100$)(图2b)存活的统计学显著的预测者。

[0171] 本研究报告了109剂在GMP条件下培养并贮存的供体衍生的MSC的安全输注。早期和晚期输注相关毒性的缺乏反映制造产品的质量及MSC的先天免疫特许状态两者。总之，我们在我们的19名患者组中在早期或晚期没有鉴定出安全性问题。

[0172] 实施例4:本发明的同种间充质基质细胞在用于对生物疗法难治性的腔性(Luminal)克罗恩氏病的疗法中的用途

[0173] 尽管出现用于克罗恩氏病(CD)的生物疗法，约四分之一的患者在第一次诊断后5年内仍然需要重大腹部手术。为了避免手术，通过骨髓或外周血干细胞移植(同种或自体)

的细胞疗法已经在少量患者中成功使用,但是需要先前的骨髓消融疗法或造血干细胞动员(mobilization)(Hommes et al.(2011),J Crohns Colitis;5:543-549)。

[0174] 比较而言,MSC是认为缺乏免疫原性并且因此逃脱免疫识别的多能成体干细胞;它们具有低水平HLA I类表达,缺乏HLA II类抗原,并且不表达共刺激分子。因而,在同种施用中,既不需要供体与接受者匹配,也不需要化疗性骨髓条件化(Le Blanc et al.(2003),Exp Hematol;31:890-896)。

[0175] 如我们在实施例2中如上证明的,我们发明的MSC成功治疗类固醇难治性GVHD。我们假设也可以使用我们的MCS治疗对其它生物疗法难治的腔性克罗恩氏病。

[0176] 我们的2期、开放标签、多中心研究包括16名具有英利昔单抗(infliximab)或阿达木单抗(adalimumab)难治性、用内窥镜确认、活动性腔性CD(CD活性指数[CDAI]＞250)的患者(21-55岁龄;6名男性)。每周对受试者给予如实施例1中制备的同种MSC($2x10^6$细胞/kg体重)的静脉内输注达4周。主要端点是第一次MSC施用后42天的临床响应(＞100点的CDAI减少);次要端点是临床消退(CDAI＜150)、内窥镜改善(CD内窥镜严重性指数[CDEIS]值＜3或减少＞5)、生活质量、C反应性蛋白的水平、和安全性。

[0177] 应用下述纳入标准:结肠或小肠CD(基于内镜检查术和组织学);CDAI＞250;在内窥镜检查下活动性疾病;对用英利昔单抗或阿达木单抗诱导难治的疾病,或者对两者的响应丧失,或者排除未来使用的这些药物中任一或两者的副作用。诱导消退的失败定义为在0、2和6周时最小三剂英利昔单抗(5mg/kg);或三剂阿达木单抗(160mg,第0周;80mg,第2周;40mg,第4周)后4周临床消退的失败。应用下述排除标准:没有炎症的慢性狭窄疾病;共存的细菌性小肠结肠炎或巨细胞病毒(CMV)感染;先前恶性;疗法期间的妊娠或不愿意生育控制;哺乳;气孔(stoma)(CDAI测量不到);或活动性败血症,包括肛周败血症或穿孔性疾病。关于伴随药物疗法,应用下文:前4周或更多周的最后一次生物制品(英利昔单抗或阿达木单抗);及在t＝-14天和42天之间,稳定剂量的皮质类固醇(在10mg泼尼松龙变化内)、免疫调节剂(硫唑嘌呤、6-巯嘌呤、甲氨蝶呤)或抗痢疾药。

[0178] 在15名完成研究的患者中,均值CDAI得分从370(中值,327;范围,256-603)降低至第42天的203(中值,129)(P＜.0001)。均值CDAI得分在每次MSC输注后降低(施用前370,第7天269,第14天240,第21天209,第28天182,和第42天203)。图3显示了在研究期里的均值克罗恩氏病活性指数(CDAI)。12名患者具有临床响应(80%;95%置信区间,72%-88%;CDAI的均值降低,211;范围102-367),8名具有临床消退(53%;范围,43%-64%;第42天均值CDAI,94;范围44-130)。图4显示了MSC治疗之前和之后的克罗恩氏病活性指数(CDAI)。7名患者具有内窥镜改善(47%),对于他们,均值CDEIS得分从21.5(范围,3.3-33)下降至11.0(范围,0.3-18.5)。1名患者具有严重不利事件(2例发育异常关联损伤),但是这可能不是由MSC引起的。

[0179] 表3显示了研究的人口统计数据,而表4和5显示了结果评估。

[0180]

患者编号	年龄	性别	疾病分布	条目CDAI	在先生物制品/免疫调节剂疗法	在先手术	MSC前的抗TNF（最后一剂前的周数）*主要失败	研究#期间伴随药物疗法	总MSC剂量
1	25	F	结肠炎	414	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	肛周脓肿引流术/插入串线	阿达木单抗 4周		9.4 x 10^6/kg
2	55	M	结肠炎	524	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	Nil	阿达木单抗 4周	硫唑嘌呤 波尼松龙10mg	8.2 x 10^6/kg
3	31	F	结肠炎	269	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	结肠次全切除术	阿达木单抗 8周	波尼松龙 12.5-15mg# 波尼松龙灌肠剂	9.8 x 10^6/kg
4	32	F	结肠炎	319	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	Nil	阿达木单抗 4周*	硫唑嘌呤	9.8 x 10^6/kg
5	23	F	结肠炎	325	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	Nil	阿达木单抗 4周	波尼松龙 20mg	7.1 x 10^6/kg
6	39	F	结肠炎	603	英利昔单抗 6MP	肛周脓肿引流术/插入串线	阿达木单抗 6个月	麦考酚酯 吗乙(Mofetil) 环丙沙星	8.0 x 10^6/kg
7	21	M	结肠炎	366	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	Nil	阿达木单抗 4周*	6MP 波尼松龙 25-15mg#	8.6 x 10^6/kg
8	27	F	结肠炎	344	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	肛周脓肿引流术/插入串线	阿达木单抗 3个月	硫唑嘌呤 波尼松龙15mg	8.3 x 10^6/kg
9	52	M	结肠炎	256	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	肛周脓肿引流术	阿达木单抗 4周	6MP	8.0 x 10^6/kg

[0181]

10	39	F	结肠炎+肛周	498	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤 甲氨蝶呤	Nil	英利昔单抗 12个月	硫唑嘌呤 泼尼松龙35mg	9.3 x 10^6/kg
11	31	M	结肠炎+肛周	295	英利昔单抗 阿达木单抗 6MP	Nil	英利昔单抗 4个月	6MP 泼尼松龙 35mg	10.1 x 10^6/kg
12	41	M	回肠结肠炎	285	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	回肠结肠切除术	阿达木单抗 4周	硫唑嘌呤	8.6 x 10^6/kg
13	46	F	回肠结肠炎	327	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	Nil	阿达木单抗 10周	泼尼松龙 20-15mg#	9.0 x 10^6/kg
14	35	M	结肠炎+肛周	397	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤 甲氨蝶呤	肛周脓肿引流术/插入串线和短暂回肠造口术	阿达木单抗 6周	甲氨蝶呤 泼尼松龙 10mg	9.4 x 10^6/kg
15	23	M	结肠炎	259	英利昔单抗 阿达木单抗 硫唑嘌呤	Nil	阿达木单抗 4周	泼尼松龙 10mg	9.7 x 10^6/kg
16	52	F	回肠	460	阿达木单抗 硫唑嘌呤 6MP	回肠结肠/回肠切除术x 3	阿达木单抗 4周*	洛哌丁胺	8.8 x 10^6/kg

*单一生物制品的主要失败；所有其它患者辜负这两种生物制品

#在给予泼尼松龙剂量的变化的情况中，初始剂量数字代表研究进入剂量，并且最后一个数字是研究端点剂量。

[0182]

表4：CDAI和内窥镜结果数据

患者数目	CDAI条目	CDAI d 7	CDAI d 14	CDAI d 21	CDAI d 28	CDAI d 42	临床响应	临床消退	CDEIS条目	CDEIS d 42	内窥镜改善
1	414	315	330	329	324	466	N	N	9.75	17.5	N
2	524	504	392	320	338	422	Y	N	19	18.5	N
3	269	160	143	-	147	122	Y	Y	19.5	19.5	N
4	319	149	186	201	193	130	Y	Y	23	18.5	Y
5	325	76	180	108	88	44	Y	Y	17	9.5	Y
6	603	362	437	169	160	236	Y	N	26	25.3	N
7	366	189	113	68	107	114	Y	Y	27.5	17.5	Y
8	344	382	223	256	177	85	Y	Y	3.3	0.3	Y
9	256	182	159	80	46	81	Y	Y	19	9.75	Y
10	498	338	256	281	135	275	Y	N	32.5	31	N
11	295	245	234	222	175	180	Y	N	28	8.6	Y
12	285	210	227	169	169	128	Y	Y	33	13	Y
13	327	97	8	20	0	50	Y	Y	6.1	10.2	N
14	397	389	291	202	-	-	-	-	18	-	-
15	259	277	276	244	236	282	N	N	31.5	32	N
16	460	454	390	472	436	436	N	N	9.1	6.25	N

[0183] 表5:生活质量和C反应性蛋白质结果数据

[0184]

患者编号	IBDQ条目	IBDQ d 42	AQoL条目	AQoL d 42	CRP条目	CRP d42

1	136	115	87	95	23	45
2	111	148	73	67	4.1	3.1
3	151	138	73	67	48	未测量
4	104	160	85	64	9.5	5.5
5	107	184	98	58	6.6	4.4
6	85	143	79	79	21	16
7	136	207	67	41	13	2.9
8	99	161	90	72	2.9	5
9	150	115	58	43	20	1.9
10	103	148	73	61	36.9	36
11	129	162	85	67	3.1	1.4
12	125	176	100	77	13	18
13	91	不可用	80	不可用	6	不可用
14	88	未测量	117	未测量	38	未测量
15	142	152	76	81	30	13
16	93	94	96	104	2.3	6.1

[0185] 我们的数据提示了静脉内同种MSC在腔性CD中的效力。在15名对抗TNF疗法难治性的具有中等至重度活动性疾病的患者中,以每周间隔的4次2x 10^6个细胞/kg输注导致12名中的临床响应(80%),8名中的临床消退(53%),和7名中的内窥镜改善(47%)。与CDAI改善平行,生活质量改善(Irvine et al.,(1994),Gastroenterol;106:287-296)。我们的数据第一次以有说服力的方式证明了对腔性疾病的有效性。

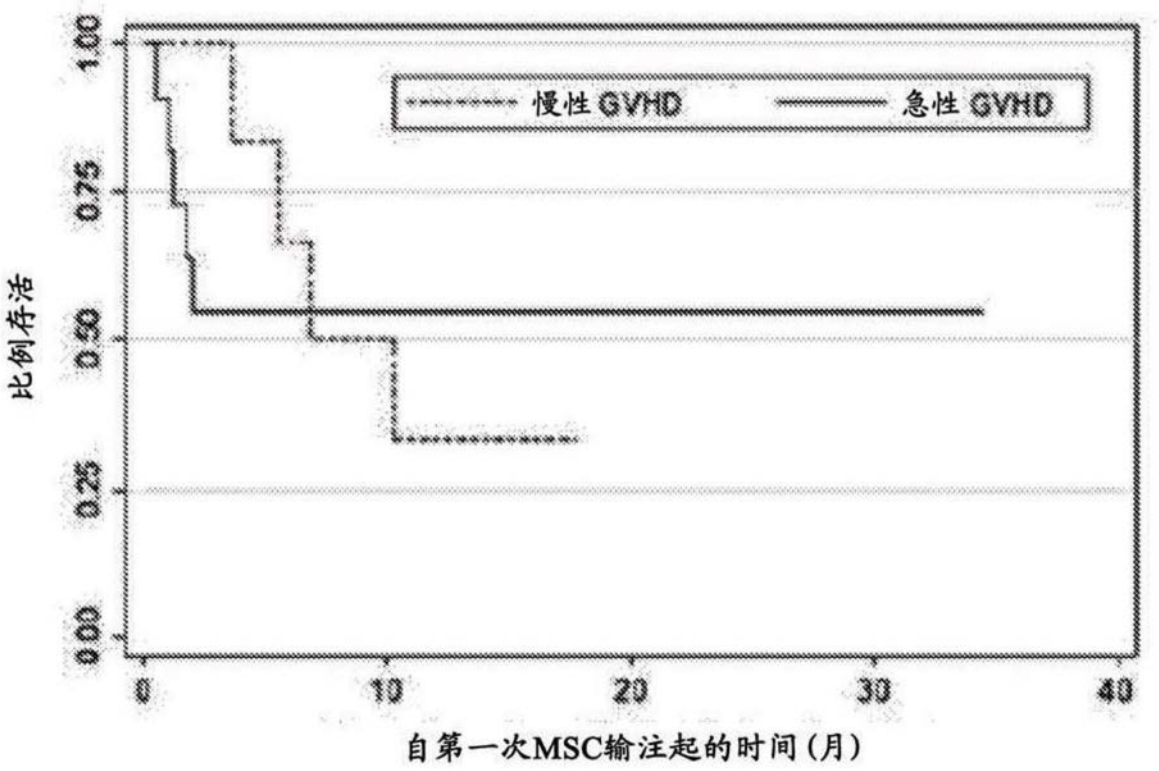

慢性 GVHD
急性 GVHD
比例存活
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
10
20
30
40
自第一次MSC输注起的时间(月)

图1

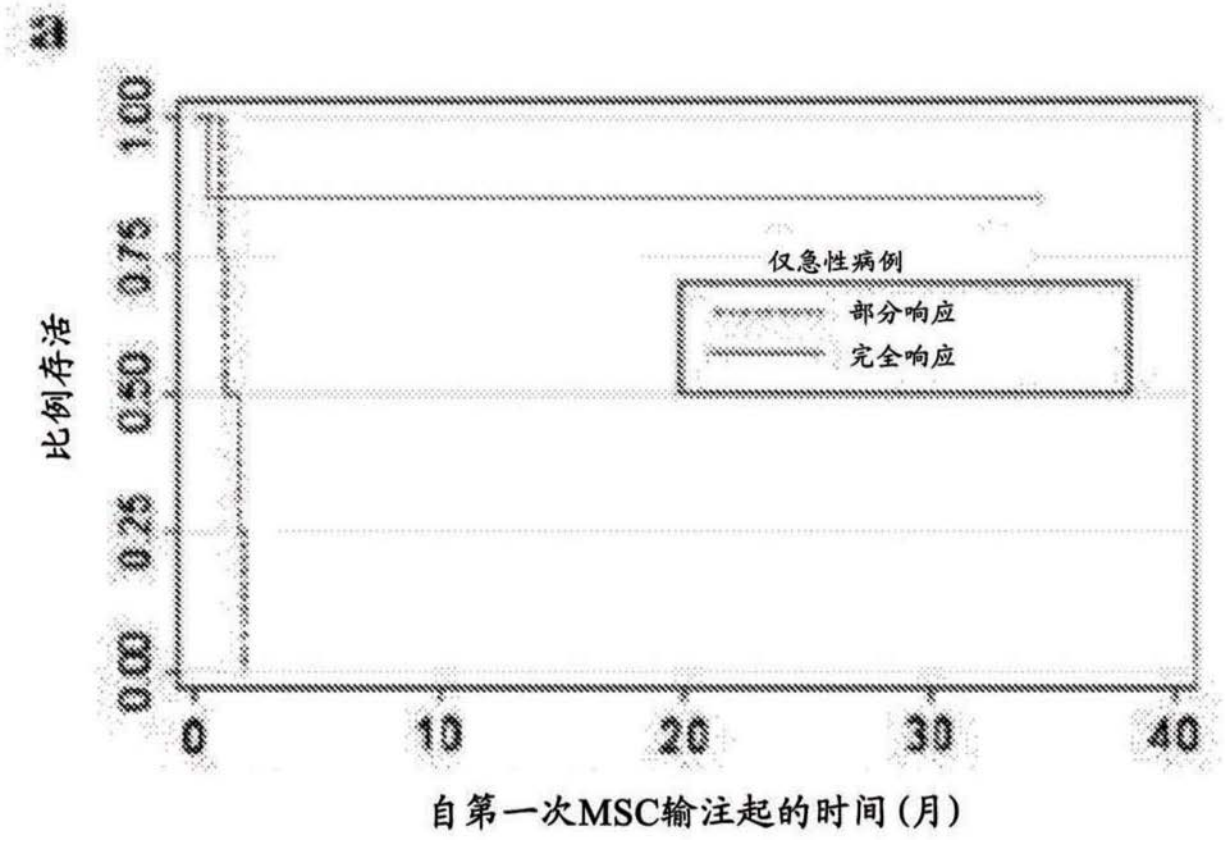

a
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
比例存活
仅急性病例
部分响应
完全响应
0
10
20
30
40
自第一次MSC输注起的时间(月)

图2A

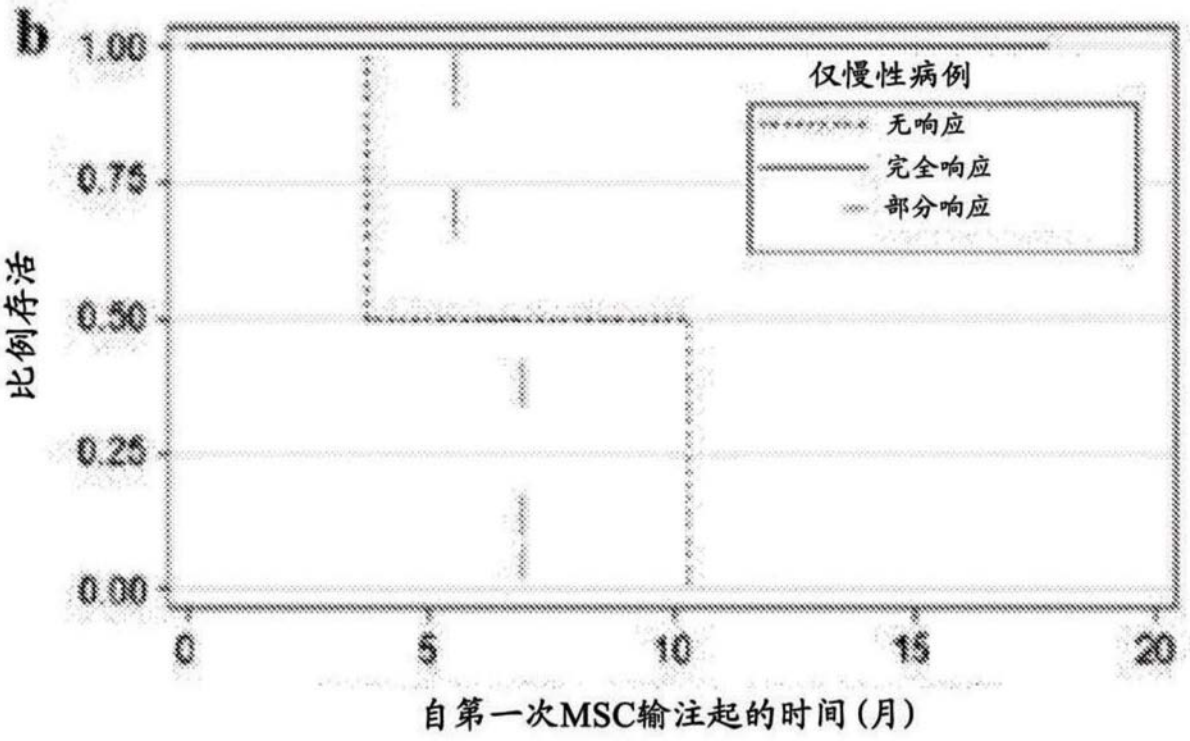

b
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
比例存活
仅慢性病例
无响应
完全响应
部分响应
0
5
10
15
20
自第一次MSC输注起的时间(月)

图2B

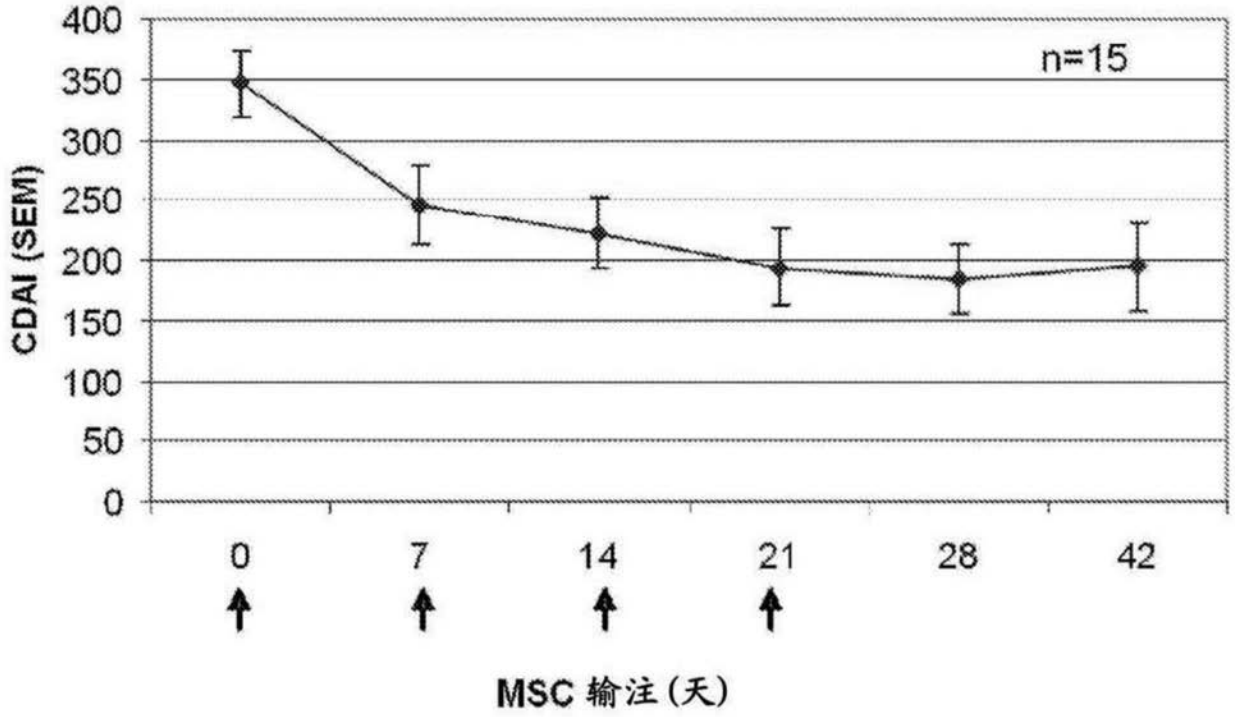

400
350
300
250
200
150
100
50
0
CDAI (SEM)
n=15
0
7
14
21
28
42
MSC 输注(天)

图3

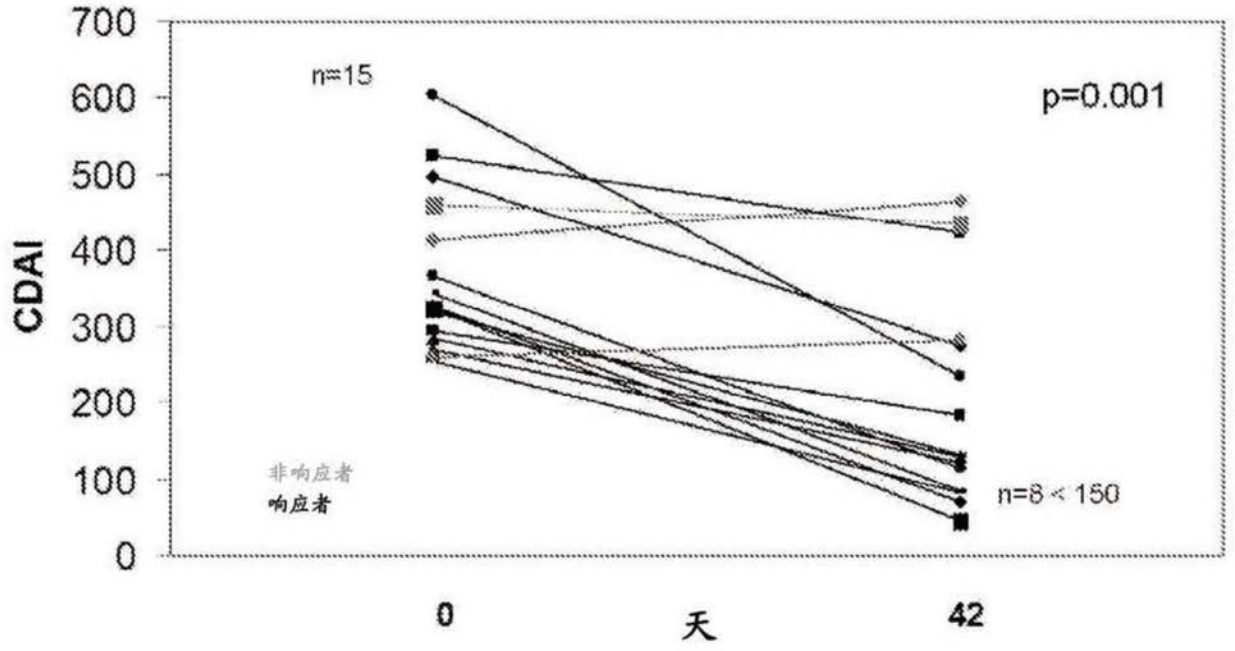

700
600
500
400
300
200
100
0
CDAI
n=15
p=0.001
非响应者
响应者
n=8 < 150
0
天
42

图4